



Universidad de Santiago de Compostela

Departamento de Microbiología y Parasitología

**ANÁLISIS DEL COMPLEXOMA DE ENVUELTA CELULAR DE
BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS MEDIANTE
ELECTROFORESIS NATIVA DE ALTA RESOLUCIÓN**

Memoria presentada por **Ernesto Diéguez Casal**

para optar al Grado de Doctor en Biología.

Santiago de Compostela, marzo de 2013

D^a Sandra Sánchez Poza, Profesora Contratada Doctor de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMA: Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Análisis del complexoma de envuelta celular de bacterias Gram-negativas mediante electroforesis nativa de alta resolución**”, que presenta D. Ernesto Diéguez Casal para optar al Grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en esta Universidad y, hallándose concluida, autorizo su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, marzo de 2013

Prof. Sandra Sánchez Poza

La realización de esta Tesis Doctoral fue posible gracias a:

- La subvención obtenida de la Consellería de Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia, código 2007/XA063.
- La subvención obtenida de la Dirección Xeral de I+D, Xunta de Galicia, código 2008/PX201.



Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible esta tesis, y especialmente:

A la profesora Sandra Sánchez Poza, directora de esta tesis, por todo el trabajo realizado y las horas gastadas en hacer de esta tesis lo que finalmente es.

A los profesores María Teresa Criado y Carlos Ferreirós, por regalarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, de realizar una tesis y por el trato maravilloso que han tenido hacia mí en todo momento.

A mis compañeras en la (dura) travesía doctoral, Liliana y Paula; a Juan, que me enseñó gran parte de las técnicas; y a los demás compañeros que han pasado por el grupo durante este tiempo (Rita, Luis, Vanesa, Liliana, Raquel, Antonio), así como a Javier. Más que compañeros han sido amigos, y trabajar así es más un placer que una obligación.

A mi familia de escritores *In crescendo*, un sustento vital en todos los sentidos de la palabra, mil gracias.

A todas las personas que en mayor o menor medida han formado parte de mi vida en el tiempo que ha durado este proyecto, gracias a su aliento y compañía muchas veces inconsciente, he logrado llegar hasta aquí; y sobre todo a mis amigos biólogos: nos ponen las cosas más difíciles, pero llegamos como poco igual de lejos que los demás.

A Joan, esta es la tesis que a ti no te dejaron hacer, de modo que gran parte de ella es para ti.

A María, por enseñarme la naturaleza inacabable de la realidad y de la magia, y que los sueños se trabajan todos y cada uno de los días que estamos aquí, *takk fyrir*.

A mis padres, por el apoyo constante durante más de 29 años, y por la educación brindada, que para bien o para mal es culpable de que sea tal y como soy, y especialmente a mi hermano Álex, por ser un compañero de aventuras y desventuras.

Y finalmente a mi abuela, por enseñarme de la vida casi todo lo que necesito saber de ella.

Relación de artículos publicados y en proceso de publicación:

Diéguez-Casal E, Freixeiro P, Costoya L, Criado MT, Ferreirós CM, Sánchez S. Characterization of the complexome of *Escherichia coli* outer membrane vesicles using high resolution Clear Native Electrophoresis. *J Proteome Res.* (SOMETIDA).

Diéguez-Casal E, Freixeiro P, Costoya L, Ferreirós CM, Criado MT, Sánchez S. High resolution Clear Native Electrophoresis analysis of the *Serratia marcescens* cell envelope complexome. *J Proteome Res.* (SOMETIDA).

Freixeiro P, Diéguez-Casal E, Costoya L, Marzoa J, Ferreirós CM, Criado MT, Sánchez S. High resolution Clear Native Electrophoresis (hrCNE) allows a detailed analysis of the heterotrimeric structure of recombinant *Neisseria meningitidis* porins inserted into liposomes. *J Proteome Res.* 2013. 12 (2): 777 – 784. doi: 10.1021/pr3008573.

Freixeiro P, Diéguez-Casal E, Costoya L, Seijo B, Ferreirós CM, Criado MT, Sánchez S. Study of the stability of proteoliposomes as vehicles for vaccines against *Neisseria meningitidis* based on recombinant porin complexes. *Int J Pharm.* 2013. 443 (1-2): 1-8. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.12.046.

Marzoa J, Sánchez S, Costoya L, Diéguez-Casal E, Freixeiro P, Brookes C, Allen L, Taylor S, Gorringe AR, Ferreirós CM, Criado MT. Induction of immune responses by purified outer membrane protein complexes from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine.* 2012. 30 (13): 2387 – 2395. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.123.



A mi abuela

**Análisis del complexoma de envuelta celular de
bacterias Gram-negativas mediante
electroforesis nativa de alta resolución**

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	9
TABLA DE ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	13
1. ESTRUCTURA DE LA ENVUELTA CELULAR DE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS....	15
1.1. Envuelta celular de bacterias Gram-negativas.....	16
1.1.1. Estructura de la membrana externa.....	17
1.1.2. Estructura de la membrana interna.....	21
1.1.3. Periplasma.....	22
1.1.4. Otras estructuras de la envuelta celular.....	22
1.2. Sistemas funcionales de la envuelta celular de bacterias Gram-negativas.....	25
1.2.1. Sistemas de secreción.	25
1.2.2. Bombas de eflujo.	34
2. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE INTERACCIÓN PROTEICA.	39
2.1. Técnicas electroforéticas.	40
2.1.1. BNE-PAGE.....	41
2.1.2. CNE-PAGE.	43
2.1.3. HrCNE-PAGE.	43
2.2. Técnicas no electroforéticas.	46
2.2.1. Co-inmunoprecipitación.....	46
2.2.2. Técnicas basadas en fluorescencia.	47
2.2.3. Resonancia superficial del plasmón (SPR).....	48
2.2.4. Etiquetas de afinidad.	48
2.2.5. Sistema del doble híbrido.....	49
2.2.6. “Cross-linking”.....	50
2.3. Espectrometría de masas.....	62
2.3.1. Introducción.	62
2.3.2. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS).....	66
3. BACTERIAS OBJETO DE ESTUDIO.	70
3.1. <i>Escherichia coli</i>	70
3.2. <i>Serratia marcescens</i>	72
3.3. <i>Neisseria meningitidis</i> H44/76.	74
OBJETIVOS E INTERÉS DEL TRABAJO	77
MATERIAL Y MÉTODOS	83
1. ESQUEMA EXPERIMENTAL.....	85
2. CEPAS BACTERIANAS.....	86
3. CONSERVACIÓN.....	86
4. CULTIVO.....	86
5. EXTRACCIÓN DE OMVS MEDIANTE PRENSA DE FRENCH.	87
6. VERIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO.....	88
7. “CROSS-LINKING” QUÍMICO.	89
8. ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO 1D SDS-PAGE.	90
9. ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPLEJOS PROTEICOS 1D HRCNE (DDM).....	91
10. ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPLEJOS PROTEICOS Y SU COMPOSICIÓN 2D hrCNE/SDS-PAGE.....	93
11. ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPLEJOS PROTEICOS Y SU MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA 2DhrCNE/hrCNE.....	94
12. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS IMÁGENES DE GELES.....	94
13. “WESTERN-BLOTTING” DE PROTEOLIPOSOMAS.	94

14.	“WESTERN-BLOTTING” DE OMVS.	95
15.	IDENTIFICACIÓN DE COMPLEJOS PROTEICOS Y COMPONENTES MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	96
RESULTADOS.....		101
1.	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE <i>E. COLI</i>	103
1.1.	Análisis electroforético e identificación de proteínas por nanoLC-MS/MS.	103
1.2.	Análisis electroforético e identificación de proteínas de 2D hrCNE/SDS-PAGE por MALDI-TOF/.....	111
2.	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE <i>S. MARCESCENS</i>	119
2.1.	Análisis electroforético e identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF.	119
2.2.	Análisis electroforético e identificación de proteínas de 2D hrCNE/SDS-PAGE por MALDI-TOF/TOF.	122
3.	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE OMVS MEDIANTE “CROSS-LINKING”.....	131
3.1.	Análisis de OMVs de bacterias Gram-negativas mediante “cross-linking” químico con formaldehído y hrCNE.	131
3.2.	Análisis de OMVs de bacterias Gram-negativas mediante “cross-linking” químico con Sulfo-SBED y hrCNE.	136
3.2.1.	Puesta a punto.....	136
3.2.2.	Análisis de OMVs mediante hrCNE.	140
DISCUSIÓN.....		149
1.	COMPLEXOMA DE <i>E. COLI</i>	151
2.	COMPLEXOMA DE <i>S. MARCESCENS</i>	165
3.	“CROSS-LINKING”	175
CONCLUSIONES.....		183
BIBLIOGRAFÍA.....		189

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estructura de la envuelta celular en Gram-positivas y Gram-negativas.....	16
Figura 2 Representación de la envuelta celular de Gram-negativas: esquema (izquierda); microscopía electrónica (derecha).....	17
Figura 3 Representación cenital de un trímero de OmpF de <i>E. coli</i>	20
Figura 4 Representación cenital de un trímero de maltoporina de <i>E. coli</i>	21
Figura 5 Representación esquemática de la estructura de un flagelo.....	24
Figura 6 Microfotografía de los pili de <i>E. coli</i>	25
Figura 7 Representación esquemática de la vía secretora general, dependiente del heterocomplejo Sec.....	26
Figura 8 Representación esquemática de las diferentes vías de secreción bacterianas.....	27
Figura 9 Microfotografía del proceso de evaginación de las vesículas de membrana externa (OMVs)	31
Figura 10 Esquema comparativo del mecanismo de las vías de secreción comunes (superior) y la vía de secreción mediada por OMV (inferior).....	33
Figura 11 Representación esquemática de las funciones desempeñadas por las OMV.....	34
Figura 12 Representación esquemática de los diferentes sistemas de eflujo de bacterias Gram-negativas.....	35
Figura 13 Representación esquemática del complejo formado por AcrB, AcrA y TolC en las bomba de eflujo de la familia RND.....	38
Figura 14 Esquema del análisis electroforético bidimensional: electroforesis desnaturalizante y no desnaturalizante.....	46
Figura 15 Reacción de “cross-linking” de un grupo funcional éster NHS.....	54
Figura 16 Reacción de “cross-linking” de un grupo funcional fotorreactivo.....	55
Figura 17 Tipo de productos de una reacción de “cross-linking”	56
Figura 18 Ejemplo de un esquema experimental en donde se asocia cross-linking, electroforesis y espectrometría de masas.....	57
Figura 19 Representación de una molécula de formaldehído.....	58

Figura 20	Representación esquemática de la reacción de cross-linking llevada a cabo por el formaldehído.....	59
Figura 21	Representación esquemática de una molécula de Sulfo-SBED.....	60
Figura 22	Representación esquemática de la reacción de “cross-linking” llevada a cabo por el Sulfo-SBED.....	61
Figura 23	Representación esquemática de los módulos de un espectrómetro de masas.....	63
Figura 24	Ejemplo de espectro de masas.....	63
Figura 25	Representación esquemática de la técnica de espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS.	67
Figura 26	Representación esquemática de la técnica de espectrometría de masas en tándem MALDI-TOF/TOF.	68
Figura 27	Representación esquemática del procedimiento experimental de la LC-MS/MS.	69
Figura 28	Representación esquemática simplificada del procedimiento experimental.	85
Figura 29	Representación esquemática del proceso de extracción de OMV con Prensa de French.....	88
Figura 30	Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de <i>E. coli</i> obtenido utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo.....	104
Figura 31	Mapa bidimensional de OMVs de <i>E. coli</i> obtenido mediante análisis electroforético 2D hrCNE/hrCNE, utilizando DDM en la 1D, y OG en la 2D.....	107
Figura 32	Mapa bidimensional de OMVs de <i>E. coli</i> obtenido mediante análisis electroforético 2D hrCNE/SDS-PAGE, utilizando DDM como detergente no iónico en la 1D.	112
Figura 33	Localización y función porcentual de las proteínas de OMVs de <i>E. coli</i> identificadas por espectrometría de masas.....	117
Figura 34	Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de <i>Serratia marcescens</i> obtenido utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo.....	119
Figura 35	Mapa bidimensional de OMVs de <i>S. marcescens</i> obtenido mediante análisis electroforético 2D hrCNE/hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en la 1D, y TX-100 en la 2D.....	120
Figura 36	Mapa bidimensional de OMVs de <i>S. marcescens</i> obtenido mediante	

	análisis electroforético 2D hrCNE/SDS-PAGE, utilizando DDM como detergente no iónico en la 1D.....	123
Figura 37	Localización y función porcentual de las proteínas de OMVs de <i>S. marcescens</i> identificadas por espectrometría de masas.....	129
Figura 38	Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de <i>N. meningitidis</i> sin tratar (A) y tratadas con formaldehído (B).....	132
Figura 39	Mapa bidimensional del análisis electroforético 2D hrCNE/SDS-PAGE de OMVs de <i>N. meningitidis</i> sin tratar (A) y tratadas con formaldehído (B).....	133
Figura 40	Mapa bidimensional del análisis electroforético 2D hrCNE/hrCNE de OMVs de <i>N. meningitidis</i> tratadas con formaldehído.....	134
Figura 41	Mapa bidimensional del análisis electroforético 2D hrCNE/hrCNE de OMVs de <i>N. meningitidis</i> no sometidas a tratamiento con formaldehído.....	135
Figura 42	Análisis mediante “Western-blotting” de la eficacia del Sulfo-SBED en la detección de complejos RmpM*-PorB en presencia/ausencia de DTT	138
Figura 43	Análisis mediante “Western-blotting” de la eficacia del Sulfo-SBED en la detección de complejos RmpM*-PorB en presencia/ausencia de βmercaptoetanol.....	139
Figura 44	Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de <i>N. meningitidis</i> H44/76 tratadas con Sulfo-SBED (OMV*) y no tratadas (C, control), utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo.	141
Figura 45	Esquema del proceso experimental empleado para la detección de la transferencia del grupo de biotina del agente Sulfo-SBED entre proteínas asociadas.....	142
Figura 46	Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de <i>E. coli</i> tratadas con Sulfo-SBED, fotoactivadas (OMV FA) y no fotactivadas (OMV NFA), utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, y deoxicolato sódico como detergente aniónico.....	143
Figura 47	Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de <i>S. marcescens</i> tratadas con Sulfo-SBED, fotoactivadas (OMV FA) y no fotactivadas (OMV NFA), utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, y deoxicolato sódico como detergente aniónico...	143
Figura 48	Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de <i>N. meningitidis</i>	

	H44/76 tratadas con Sulfo-SBED, fotoactivadas (OMV FA) y no fotactivadas (OMV NFA), utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, y deoxicolato sódico como detergente aniónico.....	144
Figura 49	Mapas proteicos obtenidos mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE (arriba) y sus correspondientes “Western-blots” (abajo) de OMVs de <i>N. meningitidis</i> fotoactivadas (izquierda) y no fotactivadas (derecha)..	145
Figura 50	Mapas proteicos obtenidos mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE (arriba) y sus correspondientes “Western-blots” (abajo) de OMVs de <i>E. coli</i> fotoactivadas (izquierda) y no fotactivadas (derecha).....	146
Figura 51	Mapas proteicos obtenidos mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE (arriba) y sus correspondientes “Western-blots” (abajo) de OMVs de <i>S. marcescens</i> fotoactivadas (izquierda) y no fotactivadas (derecha). Los puntos señalados con un asterisco rojo se corresponden a posibles componentes de un mismo complejo en los cuales se produce una transferencia de la molécula de biotina.....	147
Figura 52	Representación de la Fdh-N (de izq. a der.): visión de un trímero paralelo a la membrana, de un monómero de Fdh-N y de un trímero desde el periplasma.....	160
Figura 53	Representación de una ATPasa.....	162
Figura 54	Representación del sistema de biogénesis formado por el complejo YaeT y el SecYEG.....	169

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Detergentes no iónicos y aniónicos utilizados en la “high resolution Clear Native Electrophoresis”	44
Tabla 2 Lista de agentes de “cross-linking” homobifuncionales.....	51
Tabla 3 Lista de agentes de “cross-linking” heterobifuncionales.....	52
Tabla 4 Identificación por nanoLC-MS/MS de los principales componentes de las OMVs de <i>E. coli</i> detectadas mediante 1D hrCNE	105
Tabla 5 Identificación por nanoLC-MS/MS de los principales componentes de las OMVs de <i>E. coli</i> detectadas mediante 2D hrCNE/hrCNE	108
Tabla 6 Identificación por MALDI-TOF/TOF de los principales componentes de OMVs de <i>E. coli</i> detectados mediante 2D hrCNE/SDSPAGE	113
Tabla 7 Identificación por MALDI-TOF/TOF de los principales componentes de las OMVs de <i>S. marcescens</i> detectados mediante 2D hrCNE/hrCNE	121
Tabla 8 Identificación por MALDI-TOF/TOF de los principales componentes de OMVs de <i>S. marcescens</i> detectados mediante 2D hrCNE(DDM)/SDSPAGE	124

TABLA DE ABREVIATURAS

ABC	"ATP-binding cassette"
BCA	Ácido bicinónico ("Bicinchoninic acid")
BNE	"Blue Native Electrophoresis"
BRET	Bioluminiscencia por transferencia de energía resonante ("Bioluminescence Resonance Energy Transfer")
CBB	"Coomassie Brilliant Blue"
CNE	"Clear Native Electrophoresis"
CU	"Chaperone-usher"
DDM	n-dodecil- β -D-maltósido ("n-dodecyl- β -D-maltoside")
DIG	Digitonina
DOC	Deoxicolato sódico
ESI	Ionización por electrospray ("Electrospray ionization")
FRET	Fluorescencia por transferencia de energía resonante ("Fluorescence Resonance Energy Transfer")
hrCNE	"high resolution Clear Native Electrophoresis"
IEF	Isoelectroenfoque
LB	Luria-Bertoni
LOS	Lipooligosacárido
LPS	Lipopolisacárido
MALDI	"Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization"
MATE	"Multidrug and Toxic Compound Extrusion"
MFS	"Major Facilitator Superfamily"
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
OG	Octil- β -D-glucopiranosido ("Octyl- β -D-glucopyranoside")
OMP	Proteínas de membrana externa ("Outer membrane proteins")
OMV	Vesículas de membrana externa ("Outer Membrane Vesicles")
PA	Poliacrilamida
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida ("Polyacrylamide Gel Electrophoresis")
PVDF	Polivinilidenofluoruro ("Polyvinylidene fluoride")
PY	Peptone-Yeast
RND	"Resistance Nodulation Division"
SDS	Dodecilsulfato de sodio ("Sodium Dodecyl Sulfate")
SMR	"Small Multidrug Resistance"

SPR	Resonancia superficial del plasmón (“Surface Plasmon Resonance”)
Sulfo-SBED	Sulfo-N-hidroxisuccinimidil-2-(6-biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido) etil-1,3-ditiopropionato
TBS	“Tris-Buffered Saline”
TCA	Ácido tricloroacético (“Trichloroacetic acid”)
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
TOF	Tiempo de vuelo (“Time-of-flight”)
TX100	Triton X-100





INTRODUCCIÓN

1. ESTRUCTURA DE LA ENVUELTA CELULAR DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.

Los científicos saben desde mediados del siglo XIX que la unidad funcional de los seres vivos es la célula, una entidad definida por una capa que la rodea y que se denomina membrana plasmática. A efectos prácticos, esto significa que todo lo que es la vida debe encontrarse contenido por dicha membrana, lo cual constituye una característica definitoria de los seres vivos. Estas membranas no presentan la capacidad de auto-ensamblarse, sino que para ello requieren energía, del mismo modo que necesitan energía para estabilizarse y conservarse en el tiempo. Las membranas biológicas suelen presentarse en forma de bicapa fosfolipídica rodeando el contenido celular: el citoplasma. Además de los componentes lipídicos, las membranas biológicas contienen numerosas proteínas, y son las proteínas, precisamente, las que convierten a las membranas biológicas en estructuras únicas.

La envuelta celular bacteriana es una estructura sumamente compleja. Al contrario que en organismos superiores, la bacteria es una célula individual que se enfrenta a un ambiente hostil e impredecible. La respuesta evolutiva de las bacterias frente a este ambiente es el desarrollo de una cubierta celular compleja y sofisticada que le sirve de protección, pero que al mismo tiempo es permeable de un modo específico, permitiendo el paso selectivo de sustancias entre el medio externo y el interior de la célula. En esta introducción se irán desgranando las principales características composicionales, estructurales y funcionales de la envuelta celular bacteriana.

Hace más de un siglo, Christian Gram desarrolló un método de marcado que le permitía clasificar a casi todas las bacterias conocidas en dos grandes grupos, y esta tinción Gram se utiliza todavía hoy en muchos laboratorios. Los dos grupos diferenciados por dicha tinción son las bacterias Gram-positivas, que retienen el colorante cristal violeta, y las bacterias Gram-negativas, que no lo retienen. La base de esta respuesta diferencial ante la aplicación de la tinción de Gram recae en las características estructurales de la envuelta celular de las bacterias (**Figura 1**).

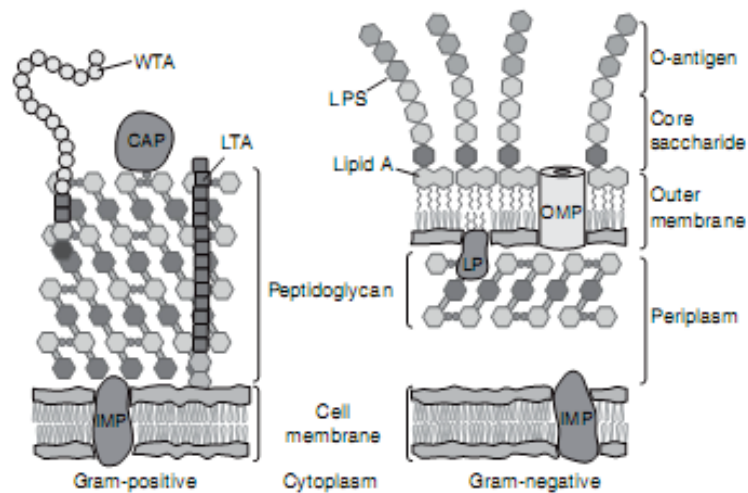


Figura 1. Estructura de la envuelta celular en Gram-positivas y Gram-negativas. Fuente: Silhavy et al. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010.

En las siguientes secciones de la **Introducción**, se profundizará en las características de la envuelta celular de las bacterias Gram-negativas.

1.1. Envuelta celular de bacterias Gram-negativas

La principal diferencia entre las bacterias Gram-negativas y las bacterias Gram-positivas recae en la presencia de una membrana externa en las primeras, además de otras diferencias estructurales asociadas, como el grosor de la capa de peptidoglicano o características concretas de los sistemas de secreción¹ (**Figura 2**).

¹Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010. 2: a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414.

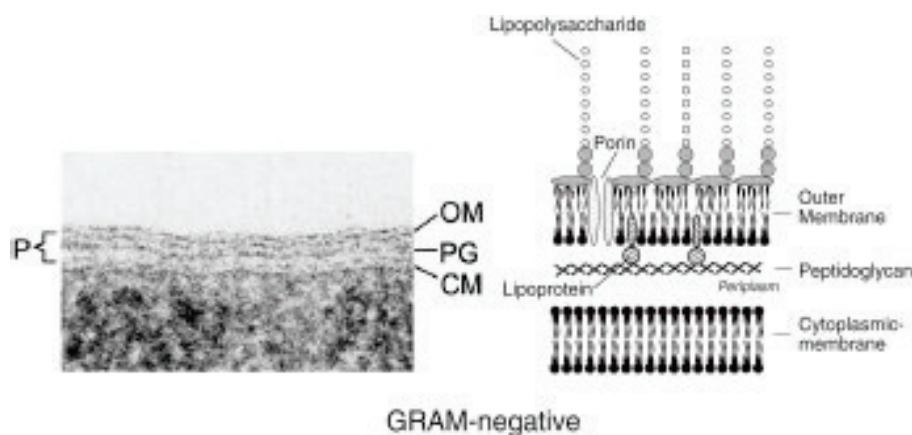


Figura 2. Representación de la envuelta celular de Gram-negativas: esquema (izquierda); microscopía electrónica (derecha). Fuente: *Desk Encyclopedia of Microbiology*.

1.1.1. Estructura de la membrana externa

La membrana externa de Gram-negativas está constituida por una bicapa lipídica de estructura asimétrica. Esto se traduce en que la cara interna es típicamente fosfolipídica, pero la externa está compuesta principalmente de glicolípidos. Entre estos glicolípidos destaca el lipopolisacárido (LPS), así como un elevado contenido proteico, mayoritariamente lipoproteínas y proteínas con conformación β .

La membrana externa de Gram-negativas es una estructura esencial y clave para su supervivencia. Aunque de forma común se la define como una estructura inerte, dado que carece de enzimas relevantes a excepción de la fosfolipasa, la proteasa OmpT² y una enzima modificadora del LPS, la PagP³. A pesar de ello, la membrana externa funciona como una barrera que protege a la bacteria del medio ambiente que la rodea. Esto es particularmente importante, puesto que las bacterias Gram-negativas habitan ambientes especialmente hostiles. *Salmonella*,

²Hritonenko V, Stathopoulos C. Omptin proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative Enterobacteriaceae. *Mol Membr Biol*. 2007. 24: 395-406.

³Bishop RE. The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol*. 2005. 57: 900-912.

por ejemplo, crece en presencia de sales biliares⁴, mientras que *E. coli* lo hace en el intestino⁵.

Una gran parte de la capacidad adaptativa de las bacterias Gram-negativas reside en su envuelta celular, en general, y en su membrana externa, en concreto, con la consecuencia de que este grupo bacteriano presente también mayores resistencias a la acción de los antibióticos. El género *Pseudomonas* es, a este respecto, especialmente reseñable⁶. Como parte de esta función barrera también está presente el lipopolisacárido, que se encuentra empaquetado de una forma muy densa, de modo que conforma una especie de fluido continuo impenetrable para las moléculas hidrofóbicas. Este factor, unido al hecho de que la difusión pasiva de la membrana externa se reduce a moléculas inferiores a 700 Da, convierten a esta estructura en una barrera permeable y al mismo tiempo eficaz en su función barrera y de protección.

Lipopolisacárido. El lipopolisacárido⁷ es uno de los componentes de la membrana externa más abundantes e importantes. Como se ha indicado previamente, desempeña un papel crucial de la función barrera, y además estimula el sistema inmune del hospedador, generando una respuesta endotóxica⁸. El LPS presenta una estructura de tres partes: el lípido A, el núcleo oligosacárido y el antígeno O. El lípido A es un glicolípido anclado a la membrana externa, no expuesto y conservado entre especies. El núcleo oligosacárido presenta una región interna con dos o tres residuos de gliceromannoheptosa y fosfatos adicionales y específicos de especie, además de una región externa que se une a un

⁴Alvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, Hill C. *Salmonella* spp. Survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*. 2011. 157: 3268-3281.

⁵Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect*. 2010. 12: 89-98.

⁶Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*. 2011. 19: 419-426.

⁷Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res*. 2003. 338: 2431-2447.

⁸Opal SM. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. *Int J Med Microbiol*. 2007. 297: 365-377.

residuo de heptosa. Finalmente, el antígeno O, la fracción del LPS más variable⁹, es responsable de la acción antigénica. El antígeno O está formado por una cadena de polisacáridos y presenta enorme diversidad estructural entre especies. Esto último es responsable de la variable especificidad inmunogénica entre especies.

El LPS es crucial para las bacterias Gram-negativas, y está presente en todas las especies y cepas, aunque en algunas cepas entéricas aparece modificado, con un tipo diferente de polisacárido, denominado ECA (“Enterobacterial Common Antigen”)¹⁰, mientras que en especies como *Neisseria* o *Haemophilus*, el LPS se presenta en una versión reducida, que carece de muchas cadenas laterales y se denomina lipooligosacárido (LOS)¹¹.

Proteínas de la membrana externa

Lipoproteínas. Están formadas por una fracción lipídica unida a un residuo de cisteína. Esta fracción lipídica suele incrustarse en la cara interna de la membrana interna, y anclar la lipoproteína. Aunque se cree que existen unas cien lipoproteínas descritas, muchas de sus funciones siguen siendo desconocidas. Una de las más abundantes es la lipoproteína mureica, de unos 7,2 kDa. Esta proteína se une de un modo covalente a la membrana externa y al peptidoglicano. Se trata de una proteína hidrofílica con conformación en hélice α .

Otras lipoproteínas de la membrana externa desempeñan funciones relacionadas con el eflujo de antibióticos y otras sustancias tóxicas, exclusión y osmorregulación, etc.

Proteínas de membrana externa (no lipoproteínas). El grueso de proteínas de la membrana externa presenta una estructura cilíndrica en la membrana¹². Muchas de ellas son porinas, esto es, proteínas cilíndricas con un poro interior en el que se

⁹Wang L, Wang Q, Reeves PR. The variation of O antigens in gram-negative bacteria. *Subcell Biochem.* 2010. 53: 123-152.

¹⁰Kuhn HM, Meier-Dieter U, Mayer H. ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiol Rev.* 1988. 4: 195-222.

¹¹Kahler CM, Stephens DS. Genetic basis for biosynthesis, structure, and function of meningococcal lipooligosaccharide (endotoxin). *Crit Rev Microbiol.* 1998. 24: 281-334.

¹²Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology.* 2000. 37: 239-253.

produce o bien difusión pasiva o difusión selectiva, en general referida a pequeñas moléculas. Se trata de proteínas muy abundantes en la membrana externa, hasta 250000 copias por célula.

Entre las porinas, nos encontramos con porinas inespecíficas, de un peso entre 34 y 37 kDa, mayoritarias en la membrana externa de las Gram-negativas, y cuyos monómeros se asocian para formar trímeros. La estructura conjunta continúa siendo cilíndrica, y cada monómero presenta su poro hidrofílico transmembrana de 7 a 11 Å de diámetro. Entre estas porinas destacan la OmpF (**Figura 3**), la OmpC, la PhoE, etc. Este tipo de porinas inespecíficas le aportan a la bacteria un modo no selectivo de ser permeables a solutos hidrofílicos de un tamaño menor a 600 Da, y aunque se definen generalmente como inespecíficas, presentan diferentes grados de permeabilidad: la porina OmpF favorece el paso de solutos catiónicos o neutros, mientras que la PhoE prefiere solutos aniónicos. Estas porinas están involucradas, asimismo, en el paso de antibióticos y otras sustancias¹³.



Figura 3. Representación cenital de un trímero de OmpF de *E. coli*. Cada monómero presenta un canal central. Fuente: Protein Data Bank (pdb.org).

Las porinas inespecíficas impiden el paso de solutos mayores a 600 Da, lo cual requiere la presencia de canales más específicos para que moléculas mayores puedan atravesar la membrana. Ocurre así con solutos como la maltodextrina o la maltosa, quelatos de hierro, o vitaminas. Para esos solutos de mayor tamaño, la

¹³**Delcour AH.** Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2009. 1794: 808-816.

bacteria cuenta con porinas específicas como la maltoporina o LamB¹⁴ (**Figura 4**), que permite el paso de maltosa y maltodextrinas, o el sistema transportador BtuCD¹⁵, que permite el paso de la vitamina B12. Estas porinas presentan una alta afinidad por sus solutos, al contrario que las porinas inespecíficas.



Figura 4. Representación cenital de un trímero de maltoporina de *E. coli*. Fuente: Protein Data Bank (pdb.org).

1.1.2. Estructura de la membrana interna

En los organismos procariotas, la ausencia de orgánulos celulares ha relegado las funciones desarrolladas por estos a la membrana interna. Así, la producción de energía desarrollada en las mitocondrias, la síntesis de lípidos llevada a cabo en el retículo endoplasmático liso, la secreción de proteínas que lleva a cabo el retículo endoplasmático rugoso, etc, son funciones que en las bacterias se localizan en la membrana interna, en el caso de bacterias Gram-negativas.

En las bacterias Gram-negativas, la membrana interna es una bicapa fosfolipídica típica, constituida principalmente por fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol, y que presenta pequeñas cantidades de fosfatidilserina, cardiolipina y poliisoprenoides, cuya función radica en la traslocación de azúcares activados que se requieren en la biogénesis.

¹⁴Klebb PE. Mechanism of maltodextrin transport through LamB. *Res Microbiol.* 2002. 153: 417-424.

¹⁵Korkhov VM, Mireku SA, Locher KP. Structure of AMP-PNP-bound vitamin B12 transporter BtuCD-F. *Nature.* 2012. 490: 367-372.

La membrana interna también alberga muchas funciones celulares, como la captación de hierro y otros nutrientes, componentes de bombas de eflujo que participan en la expulsión de sustancias dañinas para la bacteria, así como los componentes de los sistemas de secreción.

1.1.3. Periplasma

La membrana externa e interna delimitan un espacio denominado periplasma. Se trata de un espacio compuesto por proteínas densamente empaquetadas y un nivel de viscosidad superior al del citoplasma. Las bacterias Gram-negativas utilizan este espacio como reservorio en donde acumular enzimas degradativas peligrosas como la RNasa¹⁶ o la fosfatasa alcalina¹⁷. Debido a la presencia de RNasas tanto en el periplasma como en los lisosomas, se ha sugerido que el periplasma podría constituir un precursor evolutivo de los lisosomas debido a la presencia de este tipo de enzimas. También están presentes en este espacio proteínas de unión de periplasma, proteínas relacionadas con los sistemas de secreción y bombas de eflujo, así como proteínas dedicadas a la quimiotaxis, chaperonas, etc.

1.1.4. Otras estructuras de la envuelta celular

En la envuelta celular de Gram-negativas, además de los elementos citados previamente (la membrana externa, interna, el periplasma y la capa de peptidoglicano), existen otras estructuras, como la cápsula, flagelo y pili.

Cápsula. Parte de la virulencia y versatilidad de las bacterias patógenas Gram-negativas está relacionada con elementos de la membrana externa, pero también con otras estructuras involucradas en la patogénesis. Una de ellas es la

¹⁶ **Irie M.** Structure-function relationships of acid ribonucleases: lysosomal, vacuolar and periplasmic enzymes. *Pharmacol Ther.* 1999. 81: 77-89.

¹⁷ **Arié JP, Miot M, Sassoon N, Betton JM.** Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2006. 62: 427-437.

cápsula¹⁸, una cubierta de polisacáridos que se encuentra justo sobre la envuelta celular. Es producida por diferentes cepas, con especificidad de serotipo, y proporcionan determinantes de virulencia. Los diferentes serotipos varían en la composición específica de los azúcares, en el tipo de enlace que los une, y también en relación a las sustituciones con residuos de naturaleza no polisacáridica.

El ensamblaje de una estructura como la cápsula requiere de precursores localizados en el citoplasma, y la interacción de diversos elementos de la envuelta celular, pero este proceso permanece poco claro debido a la dificultad de separar los pasos de una forma independiente¹⁹.

Su función principal es la protección de la célula frente a las defensas del hospedador, así como el depósito de nutrientes o como vía de eliminación de desechos. Por otro lado, protege frente a la desecación, evita el ataque de bacteriófagos y permite la adhesión sobre otras células o estructuras del hospedador.

Flagelo. Los flagelos²⁰ son una estructura filamentosa cuya función principal es proporcionar movilidad a la bacteria. Aparecen exclusivamente en las bacterias, y no en arqueas y eucariotas. El flagelo es un filamento helicoidal que puede aparecer en número que va de uno a cientos, en diversos puntos de la geografía celular, y que está compuesto por varios elementos (**Figura 5**). El componente principal es la flagelina, una proteína de entre 20 y 60 kDa, con secuencias terminales muy conservadas. Estas secuencias ocupan generalmente la cara interna del filamento, lo cual lo convierte en una estructura muy estable. Para el ensamblaje del flagelo es necesaria una proteína ayudante, la FliD.

¹⁸**Whitfield C.** Biosíntesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 2006. 75: 39-68.

¹⁹**Whitfield C, Roberts IS.** Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1999. 31: 1307-1319.

²⁰**Aizawa SI.** En: Schaechter M. *Desk Enciclopedia of Microbiology*. 2004. USA. Elsevier Academic Press.

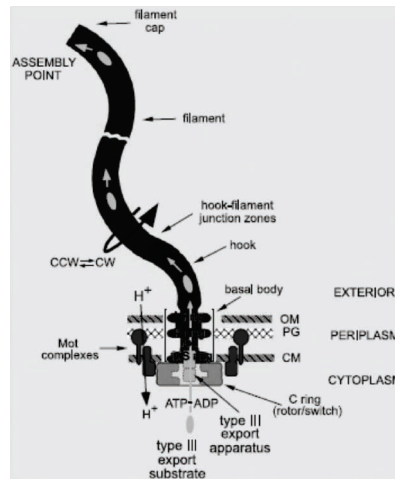


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de un flagelo. Fuente: Macnab RM. *Biochim Biophys Acta*. 2004.

Aunque la flagelina es el principal componente del flagelo, la sección final del filamento, o garfio (“hook”), es flexible y corta, y está constituida por la proteína FlgE. El cuerpo basal es la sección de flagelo que se ancla a la envuelta celular, sin intervenir directamente en la función motora del flagelo, y está constituido por una serie de anillos que se colocan en torno a un eje central. El número de anillos varía dependiendo del tipo de pared, pero en las bacterias Gram-negativas aparecen los anillos L, P, M, S y C, además del eje central (“rod”).

Pili o fimbrias. Los pili, también denominados ‘fimbriae’²¹, son filamentos poliméricos de naturaleza proteica que se expresan en la superficie de la envuelta celular (**Figura 6**). Su tamaño oscila entre 1 y 20 μm de longitud, y de 2 a 11 nm de diámetro. Se componen o bien de un único tipo de polímero o de varios diferentes, denominados pilinas o fimbrinas. Estas proteínas se disponen helicoidalmente, y han sido ampliamente estudiadas en bacterias Gram-negativas. Tanto en este grupo como en las Gram-positivas, los pili participan en los procesos de transferencia y adquisición de DNA (conjugación), también son receptores de bacteriófagos y, al igual que los flagelos, intervienen en la movilidad celular. Sin

²¹Kline KA, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ. A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends in Microbiology*. 2010. 18: 224-232. doi: 10.1016/j.tim.2010.03.002.

embargo, la principal función de los pili es la de portar las principales adhesinas en la punta del filamento. Así, los pili son utilizados por la célula para interactuar con su medio ambiente más inmediato: superficies inanimadas, tejidos, células, etc.



Figura 6. Microfotografía de los pili de *E. coli*. Fuente: Thanassi DG et al. *FEMS Microbiol Rev.* 2012.

1.2. Sistemas funcionales de la envuelta celular de bacterias Gram-negativas

1.2.1. Sistemas de secreción

La secreción extracelular de proteínas es una función celular clave para todos los seres vivos, sin excepción. En las bacterias Gram-negativas²², además, se ha desarrollado un elevado número de vías de secreción de diversa complejidad para transportar proteínas a través de la envuelta celular.

A nivel genómico, el número de genes que codifican información para secuencias señal utilizadas en vías de secreción es muy elevado, y en el caso concreto de las bacterias Gram-negativas, la existencia de una membrana externa ha provocado que estas bacterias hayan desarrollado una cantidad impresionante

²²**Gerlach RG, Hensel M.** Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology.* 2007. 297: 401-415.

de mecanismos que permiten el paso de proteínas de un lado a otro de la envuelta celular.

La vía secretora general de las bacterias está constituida por dos complejos heterotriméricos, el SecYEG y SecDFYajC (**Figura 7**). Estos complejos se encuentran situados en la membrana interna, y necesitan eventualmente la participación de una proteína adicional, denominada SecA²³. Las proteínas que son traslocadas por esta vía son traducidas como pre-proteínas, con un péptido señal en el extremo N-terminal. La traslocación post-traducciona ocurre cuando la cadena peptídica es reconocida por la proteína SecA, o por la pareja formada por SecA-SecB. En este caso, la proteína atraviesa el poro de SecYEG mientras está siendo sintetizada, y posteriormente, el péptido señal se elimina por medio de peptidasas específicas que se localizan en el periplasma.

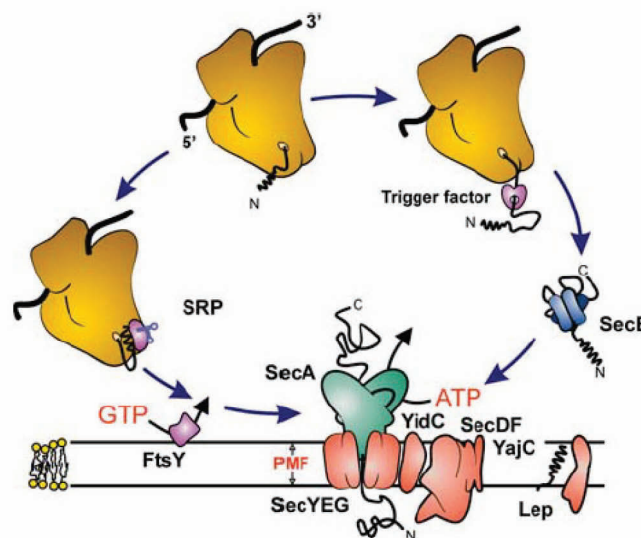


Figura 7. Representación esquemática de la vía secretora general, dependiente del heterocomplejo Sec. Fuente: Lycklama A et al. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012. 367 (1592): 1016-28.

²³**Lycklama A, Nijeholt JA, Driessen AJ.** The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012. 367: 1016-1028.

Esta vía secretora general también se denomina vía dependiente de Sec, e incluye a algunos de estos sistemas: el sistema de tipo II, de tipo V y el sistema CU (“chaperone-usher”).

Otros sistemas, por el contrario, se denominan independientes de Sec, puesto que no necesitan de la maquinaria de estos complejos para realizar la traslocación de proteínas (Figura 8).

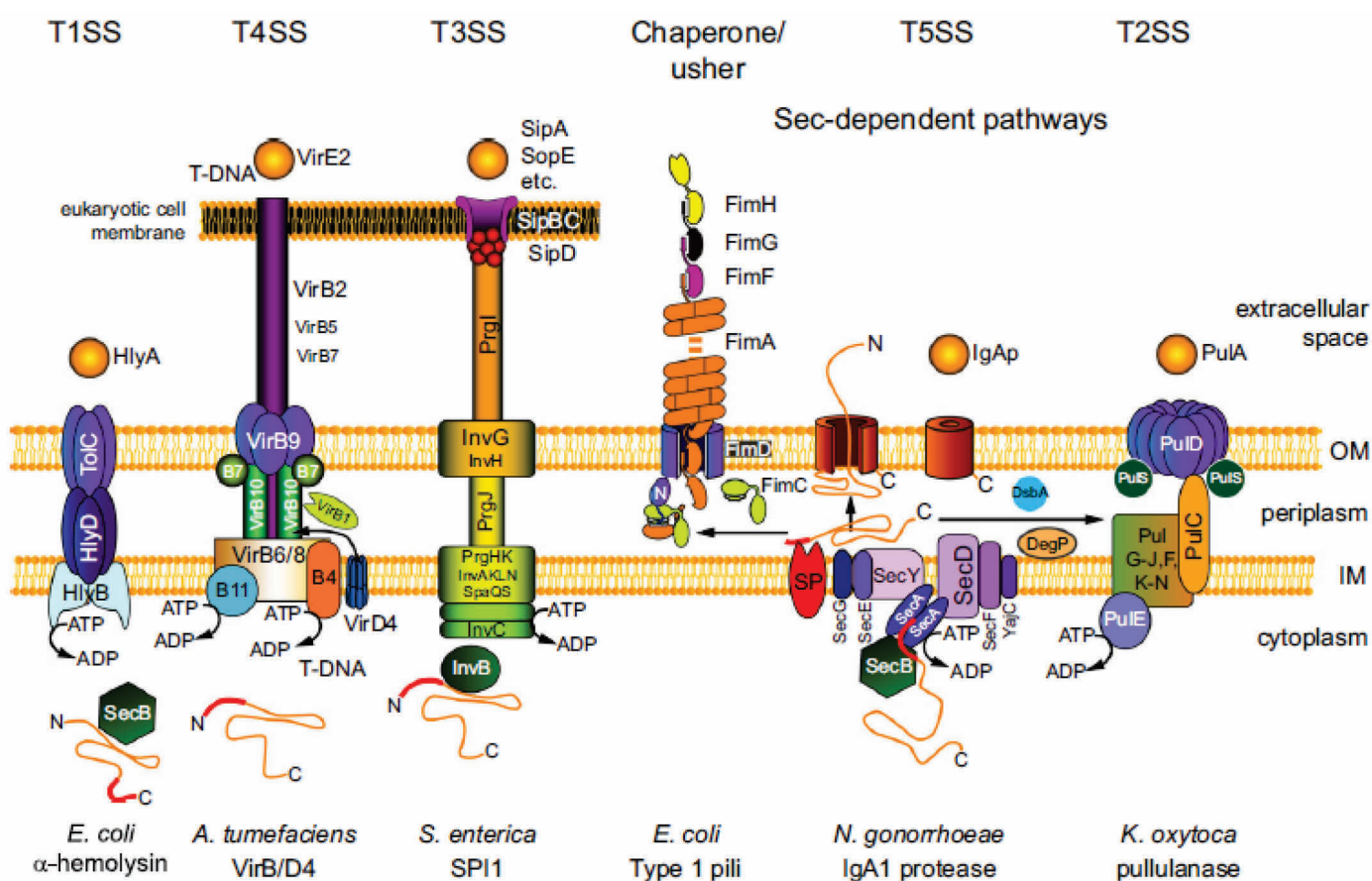


Figura 8. Representación esquemática de las diferentes vías de secreción bacterianas. Fuente: Gerlach RG et al. *International Journal of Medical Microbiology*. 297 (2007). 401-415.

Tipo I. El sistema de secreción de tipo I, o sistema ABC (“ATP-binding cassette”)²⁴ está constituido por tres elementos: un exportador ABC situado en la membrana interna, una proteína de fusión de membrana y una proteína de

²⁴Davidson AL, Maloney PC. ABC transporters: how small machines do a big job. *Trends in Microbiology*. 2007. 15: 448-455.

membrana externa caracterizada por presentar un poro en su estructura. Se trata de un sistema independiente de la maquinaria Sec, y por tanto, consigue traslocar un amplio grupo de sustratos desde el citoplasma hasta el espacio extracelular en un único paso y sin intermediarios periplasmáticos. Una gran parte de las proteínas traslocadas presentan una secuencia señal C-terminal que no se elimina posteriormente.

El ejemplo clásico y más estudiado de este sistema es el que se encarga, en *E. coli*, del transporte de la exotoxina α -hemolisina, por medio del transportador Lib (transportador ABC), la proteína de fusión de membrana HlyD²⁵ y una proteína de membrana externa, la TolC, que también participa en los sistemas RND que se explican en la sección siguiente.

Tipo II. El sistema de secreción de tipo II es dependiente de la maquinaria Sec, y es utilizado por un gran número de bacterias Gram-negativas para segregar determinadas enzimas y toxinas más allá de su membrana externa.

Uno de los ejemplos más estudiados es el de la pululanasa²⁶, de *Klebsiella oxytoca*. En este caso, se ha descrito que la proteína PulD forma una especie de anillo con una cavidad interior en la membrana externa, mientras que la lipoproteína PulS parece ser una parte esencial del sistema. Por otro lado, también es crucial la presencia de un grupo multimérico en la membrana interna (PulG, PulH, PulI, PulF, PulK, PulL, PulM, PulN).

Tipo III. El sistema de secreción de tipo III suele relacionarse con el sistema flagelar, tanto a nivel estructural como evolutivo. Presenta estructuras que atraviesan no sólo la envuelta celular de la bacteria, sino también la envuelta celular de la célula hospedadora. Se trata de al menos 20 diferentes subunidades,

²⁵Holland IB, Schmitt L, Young J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol.* 2005. 22: 29-39.

²⁶Pugsley AP, Francetic O, Hardie K, Possot OM, Sauvonnnet N, Seydel A. Pullulanase: model protein substrate for the general secretory pathway of gram-negative bacteria. *Folia Microbiol (Praha).* 1997. 42: 184-192.

que en conjunto también se denominan inyectosomas o “molecular needles”²⁷. De un modo similar a la estructura de los flagelos, en el sistema de tipo III nos encontramos con un cuerpo basal formado por diversos anillos oligoméricos, insertados en la membrana interna. Se le suma a esto un cilindro periplasmático, así como una ATPasa asociada en la cara citosólica de la membrana interna, que se encarga de proporcionar la energía para los diversos procesos en los que el sistema se ve involucrado.

Una característica diferencial de este sistema es la presencia de un grupo de chaperonas que estabilizan las proteínas efectoras participantes. La presencia de secretinas en la composición también participa en esta estabilidad, anclando el complejo de la jeringa molecular, que presenta unas dimensiones de 20 a 30 Å de diámetro y un canal interno.

Tipo IV. El sistema de secreción de tipo IV, al igual que el de tipo III, es un sistema independiente de Sec, y se caracteriza principalmente porque permite la traslocación de proteínas o complejos proteicos y DNA de cadena sencilla. Parece estar evolutivamente relacionado con la maquinaria utilizada para la conjugación.

Generalmente se distinguen dos grupos en este sistema, el IV-A y el IV-B. El más conocido es el IV-A, en donde el reclutamiento y direccionamiento hacia la membrana interna es llevado a cabo por un homohexámero de VirD4, que actúa como proteína de unión, y que está relacionada de forma estable con VirB10. Los componentes de la estructura transmembrana forman parte de la familia mpf (“mating-pair formation”)²⁸, mientras que las proteínas Vir desarrollan diversas funciones: VirB3 y VirB6-10 forman un canal en el periplasma; VirB9 es similar a secretinas y forma un poro en la membrana externa; VirB4 y VirB11 son proteínas con función ATPasa; etc.

²⁷**Cornelis GR.** The type III secretion injectisome, a complex nanomachine for intracellular ‘toxin’ delivery. *Biol Chem.* 2010. 391: 745-751.

²⁸**Schröder G, Lanka E.** The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid.* 2005. 54: 1-25.

El sistema IV-B ha sido estudiado extensivamente en *Legionella pneumophila*²⁹, aunque su comprensión es mucho menor que la del sistema IV-A.

Tipo V. El sistema de secreción de tipo V engloba varios subtipos, principalmente el sistema AT, el sistema “two-partner” o el sistema Oca (“oligomeric coiled-coil adhesin”)³⁰. Son sistemas dependientes de la maquinaria Sec.

En el caso del sistema AT, sus componentes son modulares, y las proteínas presentan un extremo N-terminal que dirige a las proteínas diana hacia la maquinaria Sec, así como un dominio pasajero que alberga una función efectora específica, y una unidad de traslocación C-terminal.

El sistema “two-partner” se encarga de exportar grandes exoproteínas a través de la membrana externa, mediante el uso de una proteína canal perteneciente a la familia de proteínas TpsB³¹. Desempeña una función relevante en procesos patogénicos como la adherencia, histólisis, inhibición por contacto, etc, aunque también desempeña funciones no relacionadas con la patogenicia.

Sistema CU (“chaperone-usher”). El sistema CU³² suele ligarse, en general, al ensamblaje de estructuras que participan en la adhesión de las bacterias Gram-negativas a superficie, como los pili, y ha sido ampliamente estudiado en la cepa uropatogénica de *E. coli*³³.

²⁹**Luo ZQ.** *Legionella* secreted effectors and innate immune responses. *Cell Microbiol.* 2012. 14: 19-27.

³⁰**Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR.** Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol.* 2004. 6: 111-124.

³¹**Jacob-Dubuisson F, Locht C, Antoine R.** Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol.* 2001. 40: 306-313.

³²**Busch A, Waksman G.** Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012. 367: 1112-1122. doi: 10.1098/rstb.2011.0206.

³³**Zalewska-Piatek BM.** Urinary tract infections of *Escherichia coli* strains of chaperone-usher system. *Pol J Microbiol.* 2011. 60: 279-285.

Sistema de secreción mediado por vesículas de membrana externa (OMV). El sistema de secreción de vesículas de membrana externa (OMV)³⁴ es una vía de secreción característica y exclusiva de Gram-negativas (se ha descrito en *E. coli*³⁵, *N. meningitidis*³⁶, *Salmonella*³⁷, *S. marcescens*³⁸, *Shigella flexneri*³⁹, *Helicobacter pylori*⁴⁰, *Campylobacter jejuni*⁴¹ etc). Se trata de estructuras esféricas de entre 20 y 200 nm de diámetro (**Figura 9**), cuya composición, pese a su denominación, incluye proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos, lípidos, proteínas del periplasma, proteínas citosólicas, de membrana interna e incluso material genético (DNA, RNA). Su producción está regulada por las condiciones de crecimiento y por determinantes genéticos.

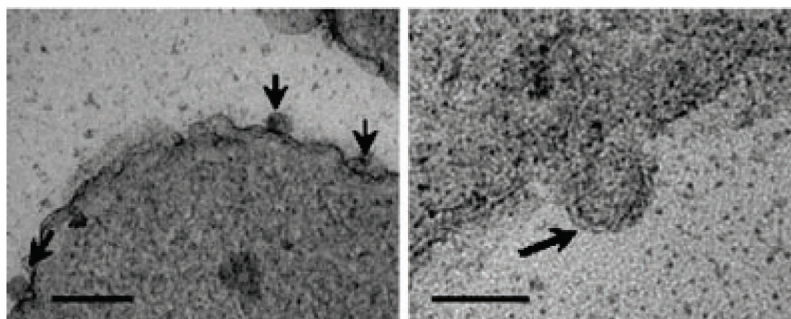


Figura 9. Microfotografía del proceso de evaginación de las vesículas de membrana externa (OMVs).

Fuente: Lee EY et al. *Mass Spectrometry Reviews*. 2008. 27: 535-555.

³⁴Lee EY, Choi DS, Kim KP, Gho YS. Proteomics in Gram-negative bacterial Outer Membrane Vesicles. *Mass Spectrometry Reviews*. 2008. 27: 535-555.

³⁵Kolling G L, Matthews KR. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. 65:1843-1848.

³⁶Moshiri A, Dashtbani-Roozbehani A, Najar Peerayeh S, Davar Siadat S. Outer membrane vesicle: a macromolecular with multifunctional activity. *Hum Vaccin Immunother.* 2012. 8: 953-955.

³⁷Yoon H, Ansonq C, Adkins JN, Heffron F. Discovery of *Salmonella* virulence factors translocated via outer membrane vesicles to murine macrophages. *Infect Immun.* 2011. 79: 2182-2192.

³⁸McMahon KJ, Castelli ME, García Vescovi E, Feldman MF. Biogenesis of outer membrane vesicles in *Serratia marcescens* is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system. *J Bacteriol.* 2012. 194: 3241-3249.

³⁹Camacho AI, de Souza J, Sánchez-Gómez S, Pardo-Ros M, Irache JM, Gamazo C. Mucosal immunization with *Shigella flexneri* outer membrane vesicles induced protection in mice. *Vaccine.* 2011. 29: 8222-8229.

⁴⁰Keenan JI, Allardyce RA. Iron influences the expression of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle-associated virulence factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 12: 1267-1273.

⁴¹Lindmark B, Rompikuntal PK, Vaitkevicius K, Song T, Mizunoe Y, Uhlin BE, Guerry P, Wai SN. Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* 2009. 9:220. doi: 10.1186/1471-2180-9-220.

Las OMVs contienen proteínas con actividad biológica funcional, y desempeñan una amplia variedad de funciones⁴² (**Figura 12**):

Sistema de secreción y reparto de proteínas. Las OMVs son utilizadas por las bacterias Gram-negativas para diseminar ciertos componentes e interactuar con el medio ambiente que las rodea. A pesar de ser caracterizadas como un sistema de secreción, se trata de una secreción diferente a la de los sistemas citados previamente, puesto que el material soluble que se libera está rodeado de material insoluble (membranas) (**Figura 10**). Por tanto, mientras que en los sistemas de secreción previamente descritos se exportaban monómeros o complejos proteicos, en el sistema de secreción mediante OMVs se liberan lípidos, proteínas de membrana y otros compuestos, y en el caso de especies patógenas, también componentes de virulencia, como adhesinas.

El recubrimiento de material insoluble ofrece protección a estas proteínas frente a proteasas presentes en el medio extracelular. Por otro lado, la secreción de OMVs permite liberar proteínas específicas a una concentración elevada muy cerca de su destino final. En algunos casos, además, las adhesinas específicas de OMVs interactúan con receptores de la célula hospedadora, de modo que la entrega es todavía más específica. Esta entrega, por otra parte, puede producirse por lisis espontánea o por unión a diana seguida de lisis, internalización o fusión.

⁴²**Kulp A, Kuehn MJ.** Biological Functions and biogenesis of secreted bacterial Outer Membrane Vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. 64: 163-184.

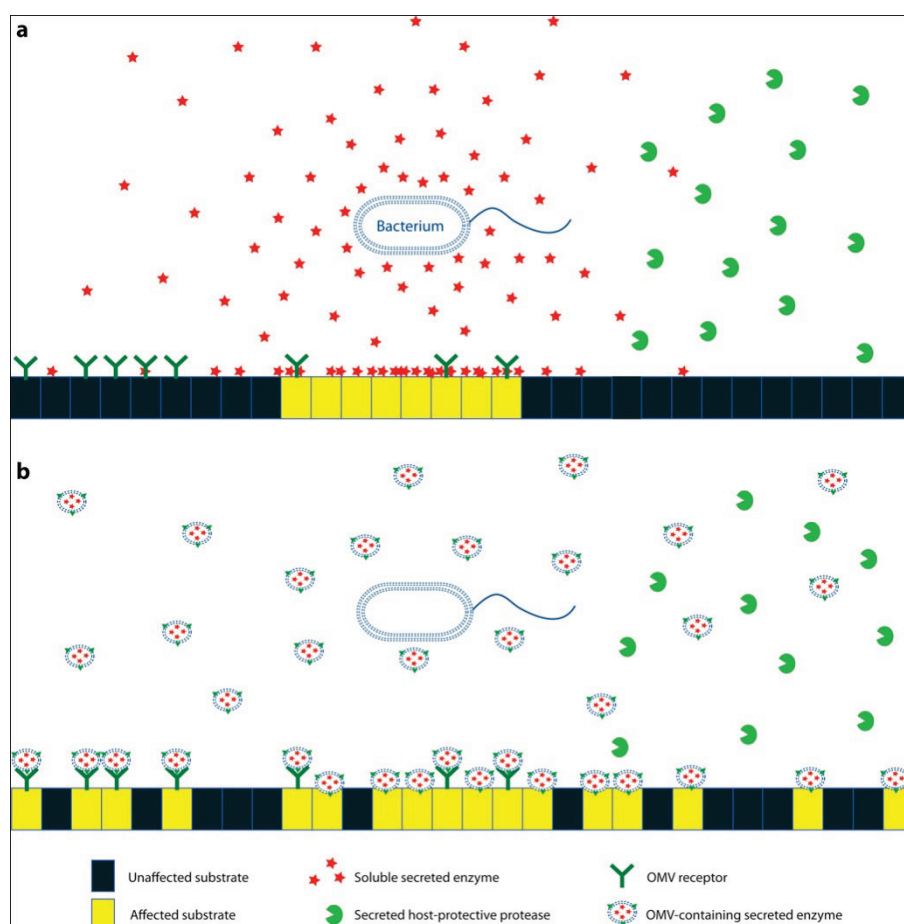


Figura 10. Esquema comparativo del mecanismo de las vías de secreción comunes (superior) y la vía de secreción mediada por OMV (inferior). Fuente: Kulp A et al. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. 64: 163-84.

Supervivencia bacteriana. Además de como sistema de secreción, las OMVs participan activamente en la supervivencia celular. Cuando la célula bacteriana es sometida a estrés, por ejemplo por acumulación de agregados proteicos tóxicos o agentes dañinos en superficie, la célula puede utilizar la liberación de OMVs como medio para deshacerse de este tipo de sustancias. Asimismo, las OMVs contienen enzimas degradativas y receptores que participan en la captación de nutrientes, así como en la captación de electrones, y participan en la formación de biofilm⁴³.

Patogénesis. Las funciones previamente indicadas son especialmente útiles para las bacterias patógenas. Permiten a la célula protegerse frente a la respuesta inmune del hospedador, y también sobrevivir en el ambiente estresante que el

⁴³**Schooling SR, Beverdige TJ.** Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol.* 2006. 188: 5945-57.

hospedador genera durante la infección, además de permitirle acceso a nutrientes escasos en el ambiente extracelular, como el hierro.

Sin embargo, las OMVs también pueden contener toxinas, en ocasiones en una concentración elevada, y entregarlas de una forma muy dirigida y específica.

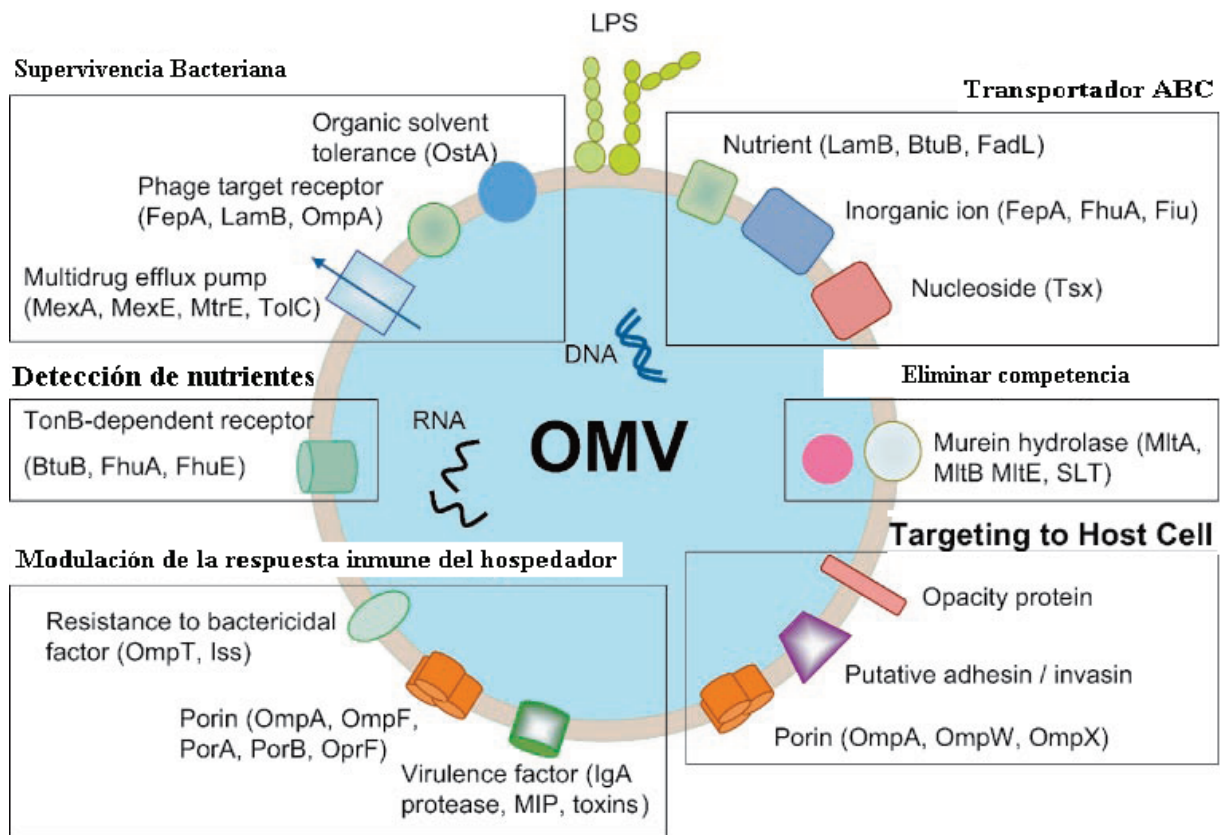


Figura 11. Representación esquemática de las funciones desempeñadas por las OMVs. Fuente: Kulp A et al. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. 64: 163-184.

1.2.2. Bombas de eflujo

Los sistemas de eflujo de drogas y otras sustancias se encargan de bombear un amplio rango de compuestos químicos estructuralmente no relacionados. Son sistemas que requieren gasto de energía, y que en general no alteran o degradan la sustancia expulsada.

Las bombas de eflujo son las principales responsables de las actuales resistencias bacterianas frente a antibióticos⁴⁴, de modo que avanzar en su conocimiento es crucial para el desarrollo de nuevas terapias.

Los sistemas de eflujo podrían clasificarse en cinco familias: MFS, ABC, SMR, RND y MATE. Las dos familias más importantes son la MFS y la ABC, aunque dependiendo de la bibliografía, también pueden clasificarse en función de sus componentes: bombas de eflujo monocomponentes o multicomponentes (**Figura 12**).


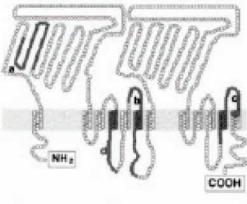
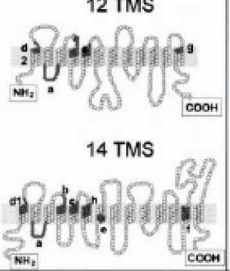
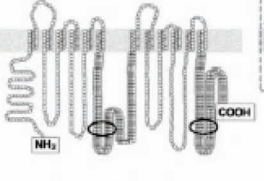
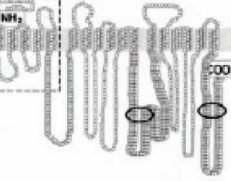
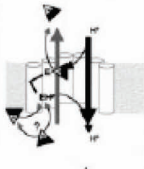
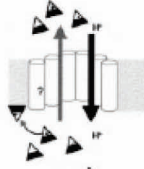
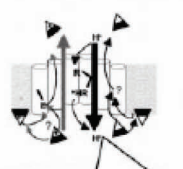
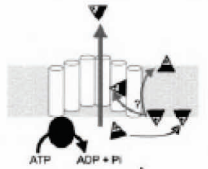
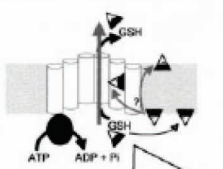
	SMR	RND	MFS	ABC	
Topology					
Mechanism	 lipophilic, multicationic substrates	 amphiphilic, charged substrates	 amphiphilic, mono- or dicationic substrates (anionic substrates for OAT)	 amphiphilic, neutral or cationic substrates	 organic, anionic substrates [sometimes, hydrophobic, neutral or mildly cationic substrates]
Antibiotics	<ul style="list-style-type: none"> ▲ tetracyclines ▲ erythromycin ▲ sulfadiazine 	<ul style="list-style-type: none"> ▲ tetracyclines ▲ fluoroquinolones ▲ erythromycin ▲ rifampicin ▲ β-lactams ▲ fluoroquinolones ▲ fusidic acid ▲ chloramphenicol □ aminoglycosides 	<ul style="list-style-type: none"> ▲ tetracyclines ▲ fluoroquinolones ▲ erythromycin ▲ lincosamides ▲ rifampicin ▲ pristinamycin ▲ chloramphenicol □ aminoglycosides 	<ul style="list-style-type: none"> ▲ tetracyclines ▲ fluoroquinolones ▲ macrolides ▲ lincosamides ▲ rifampicin ▲ chloramphenicol □ aminoglycosides 	<ul style="list-style-type: none"> ▲ fluoroquinolones ▲ tetracyclines ▲ macrolides

Figura 12. Representación esquemática de los diferentes sistemas de eflujo de bacterias Gram-negativas. Fuente: Van Bambeke F et al. *Biochem Pharmacol.* 2000. 60 (4): 457-470.

⁴⁴Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol.* 2000. 60: 457-470.

MFS. La familia de bombas de eflujo MFS ("Major Facilitator Superfamily")⁴⁵ abarca alrededor del 25% de las proteínas transportadoras de procariotas. Desempeñan su función mediante tres mecanismos diferentes: uniporte (un único sustrato, y la energía procede del propio gradiente del sustrato), simporte (se transportan dos o más sustratos en la misma dirección, utilizando como fuente de energía el gradiente electroquímico de uno de ellos) y antiporte (se transportan dos o más sustratos pero en diferentes direcciones).

Independientemente del mecanismo utilizado, los miembros de esta familia muestran una elevada especificidad, y actúan sobre sustratos variados, como iones, azúcares, fosfatos, compuestos activos de fármacos, neurotransmisores, nucleósidos, aminoácidos, péptidos, etc.

Desde un punto de vista estructural, la inmensa mayoría de miembros de la familia MFS presentan doce hélices α transmembrana unidas entre sí por loops hidrofílicos, y con los dos extremos orientados hacia el citoplasma. El poro se sitúa en el centro de esta estructura. Existe una homología entre los dominios 1 a 6 y 7 a 12, de modo que se supone que su origen se debe a una duplicación génica.

El ejemplo clásico para esta familia es el de la permeasa LacY⁴⁶.

ABC. Ya tratado previamente ^{24,25}, la familia ABC también participa expulsando sustancias a través de las membranas. La energía utilizada procede de la hidrólisis de ATP, y los transportadores pueden ser clasificados en dos grupos, por un lado los que se encargan de segregar proteínas de virulencia, y los que expulsan pequeños compuestos hidrofóbicos, algunos de los cuales pueden presentar actividad antimicrobiana.

SMR. La familia de transportadores SMR ("Small Multidrug Resistance")⁴⁷, como su propio nombre indica, está constituida por bombas de eflujo de pequeño

⁴⁵**Law CJ, Maloney PC, Wang DN.** Ins and Outs of Major Facilitator Superfamily Antiporters. *Annu Rev Microbiol.* 2008. 62: 289-305.

⁴⁶**Guan L, Kaback HR.** Properties of a LacY efflux mutant. *Biochemistry.* 2009. 48: 9250-9255.

tamaño, unos 12 kDa, integrales de membrana. Son responsables de la resistencia ante una variedad de compuestos relacionados con el amoníaco (“Quaternary Ammonia Compounds”), y también frente a otros cationes lipofílicos, entre ellos antibióticos, antisépticos y detergentes. Se cree que estas bombas atraviesan la membrana citoplasmática con cuatro hélices α conectadas entre sí por loops hidrofílicos.

Los miembros de esta familia se clasifican en tres grupos: SMP (“Small multidrug pumps”), SUG (“Suppressor of GroEL mutations”) y PSMD (“Paired Small Multidrug Resistance”).

MATE. La familia de transportadores MATE (“Multidrug And Toxic Compound Extrusion”)⁴⁸ estaba hasta no hace mucho integrada en la familia MFS. Se trata de proteínas de menos de quinientos aminoácidos de longitud, con doce dominios transmembrana en conformación hélice α , y que utilizan un gradiente de iones de sodio para la expulsión de moléculas catiónicas y fluoroquinolonas.

RND. Las bombas de eflujo de la familia RND (“Resistance Nodulation Division”) están presentes en todas las bacterias, así como arqueas y eucariotas, pero es en el grupo de las bacterias Gram-negativas en donde alcanzan su mayor complejidad⁴⁹, puesto que los transportadores RND presentan dos proteínas adicionales, una que forma un canal en la membrana externa y una proteína adaptadora que se localiza en el periplasma.

Las sustancias transportadas incluyen antibióticos, colorantes, detergentes, moléculas derivadas del hospedador, etc, y las bombas RND están detrás de la resistencia frente a un elevado número de antibióticos estructuralmente diversos.

⁴⁷**Bay DC, Rommens KL, Turner RJ.** Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008. 1778: 1814-1838.

⁴⁸**Kuroda T, Tsuchiya T.** Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. 1794: 763-768.

⁴⁹**Blair J, Piddock L.** Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*. 2009. 12: 512-519.

Las más ampliamente estudiadas son la MexB⁵⁰ de *Pseudomonas aeruginosa* y la AcrB⁵¹ de *E. coli*, ambas formadas por monómeros idénticos y embebidas en la membrana interna. Cada monómero está constituido de doce dominios transmembrana. La sección periplasmática del sistema está constituida por MexA en *P. aeruginosa* y AcrA en *E. coli*, mientras que el canal de membrana externa involucrado es TolC. Recientemente, también se ha especulado con un cuarto elemento, una proteína transmembrana denominada YajC, que formaría un complejo con AcrB una vez estuviese asociada con TolC⁵²(**Figura 13**).

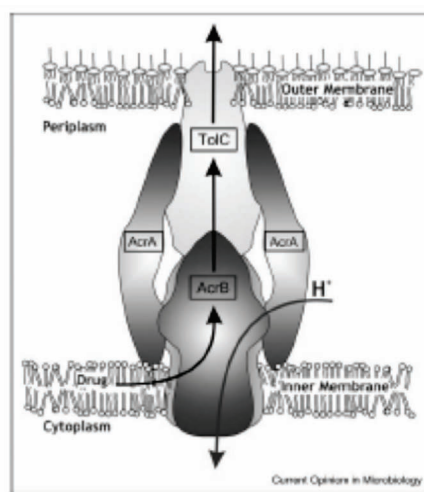


Figura 13. Representación esquemática del complejo formado por AcrB, AcrA y TolC en las bomba de eflujo de la familia RND. Fuente: Blair J et al. *Current Opinion in Microbiology*. 2009. 12: 512-519.

⁵⁰Li XZ, Zhang L, Poole K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2000. 45: 433-436.

⁵¹Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A. Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature*. 2011. 480 (7378): 565-569.

⁵²Fang J, Wei Y. Expression, purification and characterization of the *Escherichia coli* integral membrane protein YajC. *Protein Pept Lett*. 2011. 18: 601-608.

2. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE INTERACCIÓN PROTEICA

Los complejos proteicos desempeñan funciones cruciales en la biología celular, de modo que su aislamiento, caracterización y análisis son muy importantes en la comprensión del funcionamiento de la célula. En la actualidad, existe un amplio rango de técnicas experimentales que permiten en mayor o menor medida el estudio de las proteínas y del modo en que interaccionan para la formación de complejos^{53, 54, 55}. Las interacciones proteicas son fundamentales en todos los procesos biológicos, desde la formación de estructuras celulares y complejos enzimáticos hasta la regulación de vías de señalización, y existen numerosas formas de clasificarlas. En función de sus componentes, las interacciones pueden clasificarse como homólogas, cuando se producen entre subunidades idénticas (homómeros), y heterólogas, cuando se producen entre subunidades diferentes; mientras que si la clasificación se realiza en relación a la duración de la interacción, podrían definirse interacciones permanentes, en el caso de que las proteínas participantes no puedan existir de forma estable por sí mismas, o interacciones transitorias. Asimismo, las proteínas participantes en la interacción pueden verse afectadas por dicha interacción, o permanecer inalteradas.

La elección de una técnica de estudio u otra va a estar supeditada a las características de los complejos que vayan a ser analizados.

A *grosso* modo, las técnicas utilizadas en el estudio de interacciones proteicas pueden dividirse en dos clases principales: métodos electroforéticos y métodos no electroforéticos.

⁵³Lalonde S, Ehrhardt DW, Loqué D, Chen J, Rhee SY, Frommer WB. Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant J*. 2008. 53: 610–635.

⁵⁴Miernyk JA, Thelen JJ. Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J*. 2008. 53: 597–609.

⁵⁵Berggård T, Linse S, James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*. 2007. 7: 2833–2842.

2.1. Técnicas electroforéticas

En el campo de la proteómica, las estrategias de estudio basadas en electroforesis *in gel* son consideradas especialmente útiles, pues cuentan con la ventaja de que logran la separación de las proteínas de la muestra sin alterarlas, lo cual permite el fraccionamiento e identificación posteriores. Existe un amplio arsenal de técnicas electroforéticas, lo cual incrementa la capacidad de elección de la más adecuada en función de las características de cada caso particular. Permite, por ejemplo, escoger la técnica más útil para separar proteínas solubles o insolubles, y obtener una representación fiable del proteoma de la muestra. Por otro lado, las técnicas electroforéticas presentan una ventaja importante sobre las técnicas no electroforéticas: mientras que estas generalmente no permiten estudiar más que interacciones binarias, los sistemas electroforéticos pueden analizar un elevado número de complejos proteicos, aunque presentan una menor capacidad de análisis de las interacciones transitorias o de baja afinidad.

A pesar de la amplia variedad de técnicas electroforéticas desarrolladas para el análisis de proteomas, los complejos de membrana presentan una dificultad añadida y ciertas limitaciones, relacionadas principalmente con su elevada hidrofobicidad⁵⁶. Históricamente, las técnicas utilizadas para el análisis del proteoma han sido el isoelectroenfoque (IEF) y la SDS-PAGE con una baja concentración de SDS⁵⁷. El IEF desarrollado por O'Farrell^{58, 59} fue una de las primeras técnicas que logró la separación de mezclas complejas de proteínas mediante condiciones suaves que prevenían la disociación de sus componentes. En la primera dimensión, las proteínas son separadas según su punto isoelectrico (pI), es decir, estas avanzan en un gradiente de pH hasta alcanzar la posición en la que su carga neta es cero. En la segunda dimensión, las proteínas son separadas según su masa molecular en la segunda, en presencia de SDS. Sin embargo, el IEF presenta ciertas limitaciones, especialmente en el tratamiento de proteínas

⁵⁶Wittig I, Schagger H. Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics*. 2009. 9: 5214–5223.

⁵⁷Reinman S, Thornber JP. The Electrophoretic isolation and partial characterization of three chlorophyll-protein complexes from blue-green algae. *Biochim Biophys Acta*. 1979. 387: 60-63.

⁵⁸O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975. 250: 4007-4021.

⁵⁹Yokoyama R, Iwafune Y, Kawasaki H, Hirano H. Isoelectric focusing of high molecular weight protein complex under native conditions using agarose gel. *Anal Biochem*. 2009. 387: 60–63.

hidrofóbicas. La eficacia de la separación proteica se reduce al aumentar la hidrofobicidad⁶⁰. Asimismo, la propia solubilidad de las proteínas disminuye a medida que se acercan a su punto isoelectrico, conduciendo a la agregación proteica e incluso a la precipitación, y por tanto imposibilitando la transferencia a la 2D⁶¹. Se han realizado intentos para solucionar estos problemas mediante diversas estrategias^{62, 63, 64, 65}, pero el problema sigue siendo especialmente manifiesto en las proteínas muy hidrofóbicas.

Más recientemente, el equipo de Schägger y Wittig ha desarrollado un grupo de técnicas electroforéticas más versátiles que la IEF y la SDS-PAGE, en el caso concreto del estudio de complejos de membrana. Estas técnicas fueron inicialmente ideadas para el análisis de complejos proteicos respiratorios mitocondriales: la “Blue Native Electrophoresis” (BNE), la “Clear Native Electrophoresis” (CNE) y la “high resolution Clear Native Electrophoresis” (hrCNE).

Este conjunto de técnicas serán explicadas brevemente en las páginas siguientes.

2.1.1. BNE-PAGE

La “Blue Native Electrophoresis”^{66, 67} fue inicialmente desarrollada con el objetivo de aislar y separar complejos proteicos de membrana procedentes de

⁶⁰**Santoni V, Molloy M, Rabilloud T.** Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*. 2000. 21: 1037-1053.

⁶¹**Klein C, García-Rizo C, Bisle B, Scheffer B, Zischka H, Pfeiffer F, Siedler F, Oesterhelt D.** The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics*. 2005. 5: 180-197

⁶²**Zhang L, Xie J, Wang X, Liu X, Tang X, Cao R, Hu W, Nie S, Fan C, Liang S.** Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. *Proteomics*. 2005. 5: 4510-4524.

⁶³**Mattow J, Siejak F, Hagens K, Schmidt F, Koehler C, Treumann A, Schaible UE, Kaufmann SH.** An improved strategy for selective and efficient enrichment of integral plasma membrane proteins of *Mycobacteria*. *Proteomics*. 2007. 7: 1687-1701.

⁶⁴**Obermaier C, Jankowski V, Schmutzler C, Bauer J, Wildgruber R, Infanger M, Köhrle J, Krause E, Weber G, Grimm D.** Free-flow isoelectric focusing of proteins remaining in cell fragments following sonication of thyroid carcinoma cells. *Electrophoresis*. 2005. 26: 2109-2116.

⁶⁵**Busnel JM, Varenne A, Descroix S, Peltre G, Gohon Y, Gareil P.** Evaluation of capillary isoelectric focusing in glycerol-water media with a view to hydrophobic protein applications. *Electrophoresis*. 2005. 26: 3369-3379.

⁶⁶**Schägger H, von Jagow G.** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*. 1991. 199: 223-231.

⁶⁷**Reisinger V, Eichacker LA.** Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Proteomics*. 2006. 6 Suppl 2: 6-15.

material mitocondrial. Parte del éxito de la esta técnica recae en uno de los compuestos utilizados, el colorante aniónico Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB), así como en una serie de detergentes no iónicos y suaves. Los detergentes no iónicos son utilizados para lograr la solubilización de la muestra. No debe olvidarse que las proteínas de membrana son altamente hidrofóbicas. El CBB, por su parte, se añade a la muestra y también al tampón de cátodo, y actúa uniéndose a la superficie de las proteínas, mayoritariamente a los residuos de arginina, lo cual modifica tanto su solubilidad como su carga. Esta carga se vuelve negativa, y conduce la migración de las proteínas hacia el ánodo, independientemente a su *pI* particular. Existe una fracción de proteínas, sin embargo, que no puede ser separada por medio de la BNE: proteínas hidrosolubles con un *pI* neutro o básico. Estas proteínas migrarán hacia el cátodo, y por tanto, se perderán. Esta constituye una de las limitaciones de la BNE. Para las demás proteínas, la separación no se produce en función de la relación carga/masa, como ocurre en otras electroforesis como la SDS-PAGE, sino que ocurre únicamente en relación al tamaño de las proteínas. Al atravesar un gel en gradiente de poliacrilamida, cada proteína o complejo avanzará hasta que un tamaño de poro específico impida su migración.

La presencia del CBB en la superficie de las proteínas, si bien ocasiona problemas para la fracción de proteínas de *pI* neutro o básico, reduce la agregación proteica, abundante en proteínas hidrofóbicas como las de membrana, ya que las cargas negativas repartidas por la superficie de la proteína se repelen entre sí. Esta reducción significativa hace innecesario añadir otros detergentes que puedan incrementar la desnaturalización de los complejos. Sin embargo, el CBB impide la realización de ensayos posteriores de actividad catalítica o fluorimétricos. La presencia de los detergentes no iónicos, además, provoca que las micelas aniónicas mixtas imiten las características de algunos detergentes aniónicos, lo cual podría disociar complejos proteicos de interacción débil⁶⁸.

⁶⁸Neff D, Dencher NA. Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast FoF1-ATP synthase, CFo and CF1 by blue native electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999. 259: 569-575.

2.1.2. CNE-PAGE

La “Clear Native Electrophoresis”⁶⁹ emplea las mismas condiciones de solubilización de proteínas que la BNE, con la excepción de que el CBB no se añade a la muestra ni tampoco en el tampón de cátodo. Esto significa que la CNE no añade cargas negativas en la superficie de las proteínas, y por tanto, la migración dependerá de la carga intrínseca de cada proteína o complejo. Así, la CNE solamente separará proteínas que presenten un *pI* que proporcione carga neta cero al pH neutro, en el que se encuentran los geles y tampones de la electroforesis. La ausencia de CBB genera una serie de ventajas y también de inconvenientes. Por un lado, la CNE es compatible con ensayos de actividad catalítica, ensayos fluorimétricos y otros análisis posteriores, al contrario que la BNE, puesto que el principio de exclusión de estas técnicas en la BNE era la presencia de CBB. Las condiciones de la CNE son más suaves, además, que las de la BNE, lo cual permite aislar estructuras supramoleculares sensibles de disociación. Sin embargo, la misma ausencia de CBB favorece la formación de agregados proteicos durante la electroforesis, incrementándose la aparición de bandas poco definidas o con manchas.

2.1.3. hrCNE-PAGE

La “high resolution Clear Native Electrophoresis”⁷⁰ es la más reciente de las técnicas desarrolladas por el grupo de Schägger y Wittig, en un intento por aunar las ventajas de la BNE y la CNE, y eliminar o al menos reducir sus limitaciones. La hrCNE no utiliza CBB como agente aniónico, al igual que la CNE. Esto permite superar las limitaciones implícitas en el uso del colorante. Por tanto, la hrCNE puede combinarse con estudios de fluorimetría y de actividad catalítica. También se reduce la agregación proteica, y la hrCNE incorpora, asimismo, detergentes no iónicos y aniónicos en el tampón de cátodo. Estos detergentes forman micelas mixtas que serán solubilizadas e impondrán así carga negativa, solucionando el

⁶⁹Wittig I, Schägger H. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*. 2005. 5: 4338-4346.

⁷⁰Wittig I, Karas M, Schägger H. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics*. 2007. 6: 1215-1225.

problema de hidrofobicidad de forma eficaz⁵⁶. El detergente aniónico utilizado es el deoxicolato sódico (DOC), cuya presencia convierte a la hrCNE en una técnica más agresiva que la BNE, especialmente en lo que concierne a las interacciones débiles. Como detergentes no iónicos, pueden ser utilizados un amplio grupo de compuestos⁷¹: n-dodecil- β -D-maltósido (DDM), *p*-isooctilfenoxi-poli-etoxietanol (TX-100), digitonina (DIG), octil- β -glucopiranosido (OG), etc (**Tabla 1**). Se trata de detergentes suaves que mantienen solubles los complejos proteicos y evitan la disociación de sus subunidades. La elección de uno u otro debe estar íntimamente relacionada con las necesidades específicas de cada muestra.

Tabla 1. Detergentes no iónicos y aniónicos utilizados en la “high resolution Clear Native Electrophoresis”.

Detergente no iónico		Detergente aniónico
hrCNE-1	DDM	DOC
hrCNE-2	TX-100	
hrCNE-4	OG	
hrCNE-5	digitonina	

Estas características específicas hacen que la hrCNE sea una magnífica herramienta para el estudio y separación de complejos proteicos de membrana, reuniendo ventajas de técnicas precedentes y superando sus limitaciones. Ha sido utilizada con éxito en *Neisseria meningitidis*⁷², y en complejos mitocondriales humanos⁷³.

⁷¹http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15402/Detergent_Selection_Table.pdf

⁷²Marzoa J, Sánchez S, Ferreirós CM, Criado MT. Identification of *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicles complexes using 2-D high resolution clear native/SDS-PAGE. *J Proteome Res.* 2010. 9: 611-619.

⁷³Wittig I, Carrozzo R, Santorelli FM, Schägger H. Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis.* 2007. 28: 3811-3820.

Separación de complejos proteicos por BNE, CNE o hrCNE. Los complejos separados por cualquiera de estas técnicas son factibles de ser sometidos a un análisis bidimensional, a fin de obtener información relativa a los componentes que les constituyen, y así poder reducir la incertidumbre de complejos co-migrantes.

Una de las posibilidades disponibles es someter una tira de gel de la 1D en condiciones nativas a una 2D en condiciones desnaturalizantes, una SDS-PAGE. El tratamiento desnaturalizante de la tira romperá la interacción de los componentes de los complejos, y estos migrarán hacia el cátodo. Todos los puntos proteicos que se sitúen en la misma vertical en una 2D hrCNE/SDS-PAGE son susceptibles de formar parte de un mismo complejo proteico, aunque esta regla de verticalidad no es definitiva. Por otro lado, todos los puntos que se sitúan en la misma horizontal pueden representar potencialmente la misma proteína localizada en complejos de diferente peso molecular. En función de la resolución de la técnica utilizada, no es infrecuente encontrarse complejos solapados en la primera dimensión, y proteínas que co-migran en la segunda.

Otra de las posibilidades es realizar una 2D en condiciones nativas, utilizando una técnica diferente o la misma pero con diferentes condiciones (variando la concentración de detergentes, o el tipo de detergente no iónico, en el caso de la hrCNE). Esta estrategia puede ayudarnos a discernir entre varios complejos con un mismo tamaño molecular pero diferente composición.

La elección de una opción u otra dependerá, de nuevo, de las características específicas de la muestra con la que se trabaja y de las necesidades particulares. Ambas opciones se ilustran en la **Figura 14**.

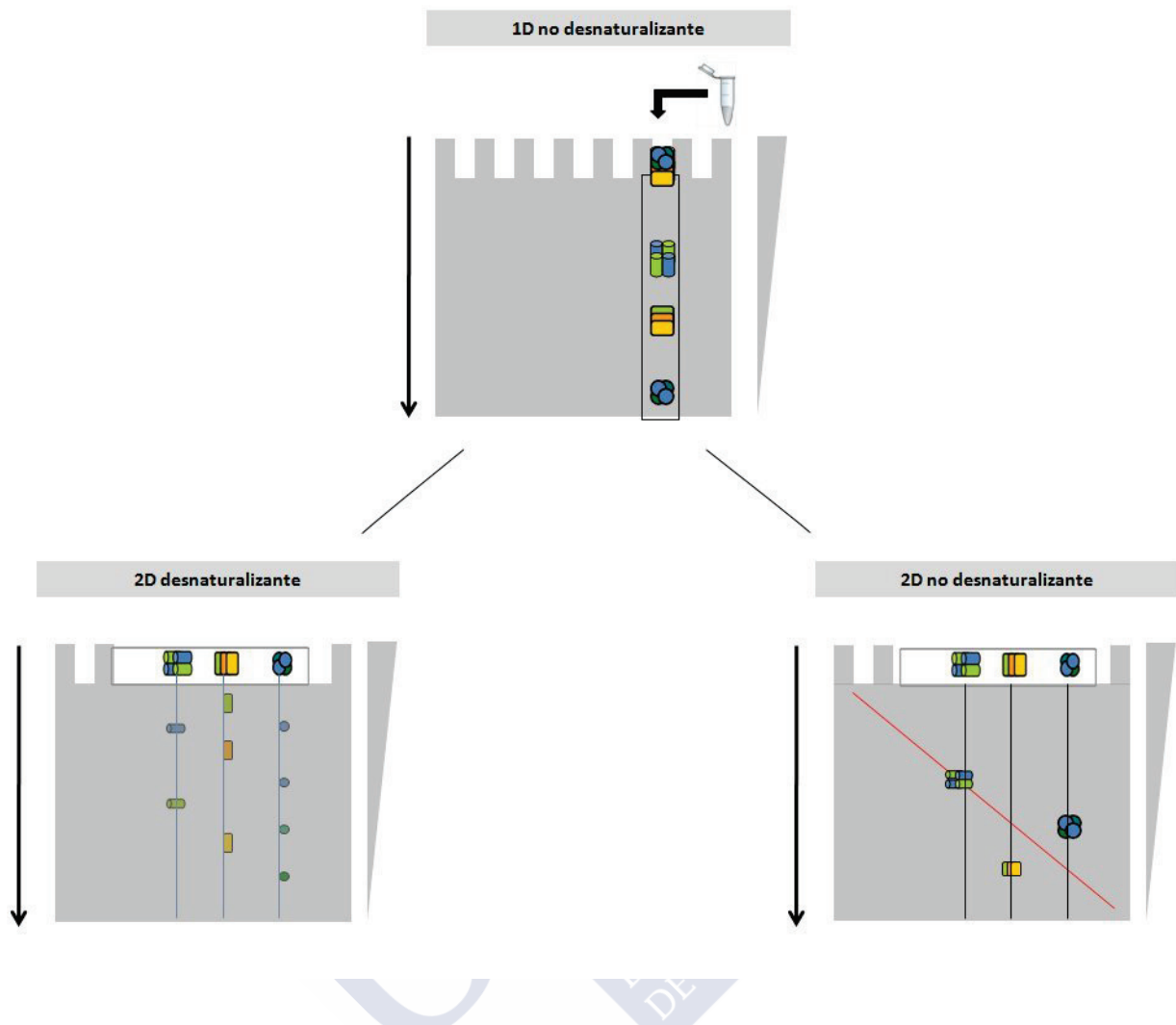


Figura 14. Esquema del análisis electroforético bidimensional: electroforesis desnaturalizante y no desnaturalizante.

2.2. Técnicas no electroforéticas

2.2.1. *Co-inmunoprecipitación*

La co-inmunoprecipitación⁷⁴ es un método clásico utilizado en el análisis de interacciones proteicas. Detecta las proteínas que interaccionan con una proteína específica, ya se trate de una interacción transitoria o permanente. La condición es

⁷⁴Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.* 1995. 59: 94-123.

que esta interacción presente una afinidad suficiente. La co-inmunoprecipitación implica la utilización de anticuerpos específicos frente a proteínas concretas. La incubación de una muestra proteica compleja generará inmunocomplejos anticuerpo-proteína, y esta proteína específica formará complejo con otras de entre la muestra compleja, que luego podrán ser co-purificadas y analizadas. Las ventajas de la co-inmunoprecipitación son su especificidad y la compatibilidad con otros análisis posteriores, pero el principal inconveniente es la necesidad de obtener anticuerpos altamente específicos.

2.2.2. Técnicas basadas en fluorescencia

La expresión de proteínas con diferentes etiquetas fluorescentes permite visualizar proteínas, complejos de proteínas, segundos mensajeros e incluso actividades enzimáticas en tiempo real y con gran resolución. Esto es posible gracias a las técnicas de transferencia de energía (RET)⁷⁵, que proporcionan información sobre las interacciones proteicas a una escala muy pequeña. La mejora constante en las técnicas de microscopía hace que su resolución sea cada vez mayor.

Los ensayos RET más ampliamente utilizados para visualizar interacciones proteicas son el FRET, que utiliza etiquetas fluorescentes, y el BRET, que utiliza etiquetas luminiscentes. El principio básico de ambas técnicas es la transferencia de energía entre una molécula donadora (fluorescente o luminiscente) a una molécula aceptora que puede ser fluorescente o no. Ambas moléculas deben encontrarse próximas. Si las proteínas que deben interaccionar se encuentran a una distancia superior a 10 nm, la transferencia de energía no será efectiva y por tanto detectaremos un falso negativo. Esta es precisamente una de las desventajas de las técnicas basadas en fluorescencia.

⁷⁵**Prinz A, Reither G, Distar M, Schultz C.** Fluorescence and bioluminescence procedures for functional proteomics. *Proteomics*. 2008. 8: 1179–1196.

2.2.3. Resonancia superficial del plasmón (SPR)

Esta técnica⁷⁶ está basada en la medición de los cambios registrados en el índice de refracción de las proteínas purificadas que forman complejo sobre una fase sólida, generalmente recubierta de una pátina de plata u oro. Esta unión, o no unión, es medida de un modo continuo, aprovechando ciertas propiedades intrínsecas de los metales utilizados, y ofrece información acerca del tiempo de asociación y disociación. La principal limitación de esta técnica es el requerimiento de proteínas purificadas, además de que el modo en que son colocadas las proteínas sobre la fase sólida puede afectar a su habilidad para interaccionar.

2.2.4. Etiquetas de afinidad

El uso de proteínas recombinantes con etiquetas⁷⁷ permite el aislamiento y purificación de complejos proteicos *in vivo* por cromatografía de afinidad. Las proteínas deben ser expresadas como proteínas quimera: la proteína cebo y otra proteína (GST) o cadena de aminoácidos (hexahistidina). Después de la expresión, la proteína cebo formará los complejos correspondientes, que podrán ser recuperados por afinidad y sometidos a análisis electroforéticos y espectrometría de masas.

Sin embargo, el principal inconveniente de esta técnica es que necesita expresiones muy elevadas y una cinética de disociación baja para el complejo. Además, su tasa de falsos positivos es alta, debido a las uniones inespecíficas, y el uso de proteínas artificiales con etiquetas genera también ciertos inconvenientes. Por un lado, la etiqueta puede interferir en la formación del complejo, o situarse en interior del complejo e impedir así la recuperación posterior, lo que daría lugar a un falso negativo. La limitación impuesta por la posibilidad de que se produzcan uniones inespecíficas se reduce con otras técnicas de afinidad: los “tap-tags”⁷⁸. En

⁷⁶Torreri P, Ceccarini M, Macioce P, Petrucci TC. Biomolecular interactions by surface plasmon resonance technology. *Ann Ist Super Sanità*. 2005. 41: 437–441.

⁷⁷von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, Bork P. Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature*. 2002. 417: 399–403.

⁷⁸Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*. 1999. 17: 1030–1032.

esta técnica, la etiqueta que se fusiona a la proteína de interés es una doble etiqueta. Ambas se colocan secuencialmente, separadas por un lugar de rotura para una proteasa específica. Esto hace necesarias dos columnas de afinidad para la purificación, y la consecuencia es que se obtiene una reducción del número de uniones inespecíficas. El principal inconveniente, sin embargo, es la posibilidad de que se pierdan proteínas que interaccionan con baja afinidad, debido a los lavados a los que la muestra es sometida. Además, necesita grandes cantidades de partida, para la detección de componentes poco representados.

2.2.5. Sistema del doble híbrido

Este sistema⁷⁹ es uno de los más ampliamente utilizados en el campo de estudio de las interacciones proteicas. Se basa en el hecho de que muchos activadores de expresión eucariotas presentan dos dominios funcionales: uno se une al promotor del DNA, y el otro es un dominio activador de la transcripción. En el sistema del doble híbrido se utilizan levaduras como sistemas de expresión heterólogos, construyendo dos plásmidos. Uno codifica la proteína cebo fusionada al dominio de unión al promotor, y el otro codifica la proteína diana fusionada al dominio de activación de la transcripción. Tras la co-expresión de ambos plásmidos, se produce la interacción entre ambas proteínas, la cebo y la diana, lo cual inducirá la transcripción de un gen marcador en el núcleo de la levadura.

La principal limitación de la técnica es que su campo se remite a interacciones binarias, y presenta una elevada tasa de falsos positivos⁸⁰ y falsos negativos⁸¹, un problema común en muchas técnicas. Esto obliga a realizar una comprobación de los resultados mediante otras técnicas. Además, resulta complejo estudiar la interacción entre proteínas usando este sistema en el caso de las proteínas hidrofóbicas.

⁷⁹**Suter B, Kittanakom S, Stagljær I.** Two-hybrid technologies in proteomics research. *Curr Opin Biotechnol.* 2008. 19: 316–323.

⁸⁰**Sprinzak E, Sattath S, Margalit H.** How reliable are experimental protein-protein interaction data? *J Mol Biol.* 2003. 11: 919–923.

⁸¹**Deng M, Mehta S, Sun F, Chen T.** Inferring domain-domain interactions from protein-protein interactions. *Genome Res.* 2002. 12: 1540–1548.

2.2.6. “Cross-linking”

El “cross-linking” químico es una técnica experimental que en el campo de la proteómica se utiliza para deducir la interacción entre dos proteínas que forman un complejo, ya sea este de naturaleza transitoria o permanente. Genéricamente, puede decirse que los procesos de extracción de proteínas afectan la interacción de los complejos proteicos, produciendo su desestabilización o incluso su disociación. La reacción de “cross-linking” químico evita esta situación en mayor o menor medida, estabilizando y fijando las interacciones proteicas mediante la formación de enlaces covalentes entre residuos aminoacídicos próximos. Esto permite que el complejo, sus componentes y su interacción, puedan ser estudiados posteriormente mediante otras técnicas experimentales. Además, el “cross-linking” también permite analizar la estructura 3D de proteínas y subunidades de complejos, la construcción de inmunotoxinas, la preparación de inmunógenos, conjugar proteína-proteína, inmovilización de anticuerpos en fase sólida, cross-linking de DNA/RNA a proteínas, etc⁸².

El principal inconveniente del “cross-linking” es que presenta numerosos falsos positivos y falsos negativos ⁸³, de modo que los resultados obtenidos no suelen ser evidencia suficiente para asegurar o descartar la existencia de una interacción, y suele recomendarse combinar esta técnica con otras adicionales. Sin embargo, esta limitación se relativiza debido a que el “cross-linking” químico permite detectar interacciones débiles que otras técnicas pasan por alto (interacciones no covalentes transitorias, interacciones específicas de condiciones fisiológicas concretas, etc), y puede aplicarse *in vivo*.

Tipos de agentes de “cross-linking”. En relación a su funcionalidad^{84, 85, 86}, los agentes de “cross-linking” pueden ser clasificados de la siguiente forma:

⁸²**Hemaprabha E.** Chemical cross-linking of proteins: a review. *J Pharm Sci Inno.* 2012. 1: 22-26.

⁸³**Trakselis MA, Alley SC, Ismael FT.** Identification and mapping of protein-protein interactions by a combination of cross-linking, cleavage, and proteomics. *Bioconjug Chem.* 2005. 16: 741–750.

⁸⁴**Sinz A.** Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *J Mass Spectrom.* 2003. 38: 1225-1237.

Agentes homobifuncionales. Los agentes de “cross-linking” homobifuncionales contienen grupos funcionales idénticos en ambos extremos reactivos, conectados por una cadena carbonada espaciadora de una determinada longitud. La reacción de “cross-linking” con estos agentes se produce sobre idénticos grupos funcionales de la proteína. Existe una amplia variedad de agentes homobifuncionales, que se ha ido incrementado en las últimas décadas, y a día de hoy están disponibles agentes con todo tipo de reactividades y diferentes longitudes de la región espaciadora.

Su principal desventaja es que el grupo de productos de “cross-linking” a los que da lugar es muy amplio, puesto que una vez se ha producido la reacción de uno de los grupos funcionales con la proteína, formando un intermediario, este último puede reaccionar con una segunda proteína o bien con grupos funcionales vecinos en la misma cadena polipeptídica. Para superar esta limitación, los protocolos que usan agentes de “cross-linking” homobifuncionales suelen desarrollarse en dos pasos: el agente reacciona en la primera con una de las proteínas. A continuación, se elimina el exceso de agente de “cross-linking”, y se procede a mezclar el agente unido a la primera proteína con la segunda proteína, para finalizar la reacción de “cross-linking”.

Tabla 2. Lista de agentes de “cross-linking” homobifuncionales⁸⁷.

Diana de la reacción de “cross-linking”	Grupo reactivo del agente de “cross-linking”	Ejemplo
Amina-amina	Éster NHS	DSG, DSS, BS3, TSAT
	Éster NHS, PEG (espaciador)	BS (PEG)5, BS (PEG)
	Éster NHS, tiol-escindible	DSP, DTSSP
	Imidoéster	DMA, DMP, DMS

⁸⁵Metz B, Kersten GFA, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HAM, de Jong A, Meiring H, ten Hove J, Hennink WE, Crommelin DJA, Jiskoot W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins. *J Biol Chem*. 2004. 279: 6235-6243.

⁸⁶Metz B, Kersten GF, Baart GJ, de Jong A, Meiring H, ten Hove J, van Steenbergen MJ, Hennink WE, Crommelin DJ, Jiskoot W. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with insulin. *Bioconj Chem*. 2006. 17: 815-822.

⁸⁷Thermo Scientific Pierce Cross-linking Technical Handbook.

Diana de la reacción de "cross-linking"	Grupo reactivo del agente de "cross-linking"	Ejemplo
Sulfidrilo-sulfidrilo	Imidoéster, tiol-escindible	DTBP
	Otros	DFDNB
	Maleimidas	BMOE, BMB, BMH, TMEA
Sulfidrilo-sulfidrilo	Maleimidas, PEG (espaciador)	BM (PEG)2, BM (PEG)3
	Maleimidas, escindible	BMDB, DTME
No selectivo	Aril azida	BASED

Agentes heterobifuncionales. Los agentes de "cross-linking" heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes, conectados por una cadena carbonada espaciadora de una determinada longitud. Se utilizan en protocolos de dos o tres pasos, para minimizar el grado de formación de agregados de alto peso molecular. Un ejemplo sería un agente con un éster NHS en un extremo y una maleimida en el otro. El éster NHS reaccionará con un grupo amino, mientras que la maleimida, en esa primera fase, no reaccionará por su estabilidad. Posteriormente, tras el paso de eliminación de exceso de agente, la maleimida se hará reaccionar con un grupo sulfidrilo.

Este tipo de agentes también pueden incorporar un grupo fotorreactivo.

Tabla 3. Lista de agentes de "cross-linking" heterobifuncionales⁸⁷.

Diana de la reacción de "cross-linking"	Grupo reactivo del agente de "cross-linking"	Ejemplo
Amina-sulfidrilo	Éster NHS / maleimida	AMAS, BMPS, GMBS y Sulfo-GMBS, MBS y Sulfo-MBS, SMCC y Sulfo-SMCC, EMCS y Sulfo-EMCS, SMPB y Sulfo-SMPB, SMPH, LC-SMCC, Sulfo-KMUS
		SM (PEG)2, SM (PEG)4,

Diana de la reacción de “cross-linking”	Grupo reactivo del agente de “cross-linking”	Ejemplo
	Éster NHS / maleimida, PEG (espaciador)	SM (PEG)6, SM (PEG)8, SM (PEG)12, SM (PEG)24
	Éster NHS / piridilditiol, escindible	SPDP, LC-SPDP y Sulfo-LC-SPDP, SMPT y Sulfo-LC-SMPT
	Éster NHS / haloacetil	SIA, SBAP, SIAB, Sulfo-SIAB
Amina-no selectivo	Éster NHS / aril azida	NHS-ASA, ANB-NOS
	Éster NHS / aril azida, escindible	Sulfo-SAND, Sulfo-SBED
	Éster NHS / diazirina	SDA y Sulfo-SDA, LC-SDA y Sulfo-LC-SDA
	Éster NHS / diazirina, escindible	SDAD y Sulfo-SDAD
Amina-carboxil	Carbodiimida	DCC, EDC
Sulfidrilo-carbohidrato	Maleimida / hidrazida	BMPH, EMCH, MPBH, KMUH
	Piridilditiol / hidrazida	PDPH
Hidroxil-sulfidrilo	Isocianato / maleimida	PMPI
Amina-DNA	Éster NHS / Psoralen	SPB

Agentes zero-length. Son los agentes que presentan menor tamaño. Incluyen como grupos funcionales las carbodiimidas.

Agentes trifuncionales. Los agentes de “cross-linking” trifuncionales son de desarrollo relativamente reciente. Poseen tres grupos reactivos diferentes, incorporando elementos del concepto ‘agente heterobifuncional’ más un grupo funcional adicional que es capaz de unirse específicamente a una tercera proteína o ser utilizado en una purificación por afinidad, como etiqueta.

Grupos funcionales de los agentes de “cross-linking”. El proceso de “cross-linking” químico implica la reacción de un grupo funcional del agente de “cross-

linking” con los grupos funcionales de las proteínas en estudio mediante la formación de enlaces covalentes. La amplia variedad de agentes de “cross-linking” estudiados y disponibles comercialmente llevan a cabo su función mediante determinados grupos funcionales⁸².

Agentes con grupos amino-reactivos. Los grupos amino-reactivos son los más comunes, y las reacciones primarias llevada a cabo por estos grupos sobre las aminas son la acilación y la alquilación, reacciones que de forma general ocurren muy rápidamente. Grupos amino-reactivos son:

- Ésteres NHS (N-Hydroxysuccinimide ésteres). Son probablemente los grupos funcionales amino-reactivos más utilizados. Muchos son insolubles en tampones acuosos, de modo que necesitan ser disueltos en solventes orgánicos, o bien utilizar sus derivados sulfonados, que si son hidrosolubles. La reacción se detalla en la **Figura 15**.

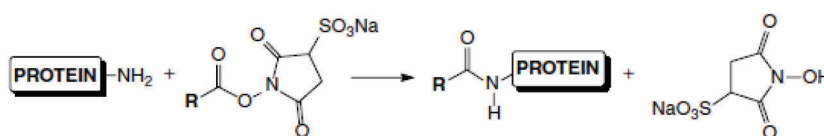


Figura 15. Reacción de cross-linking de un grupo funcional éster NHS. Fuente: Sinz A. *J Mass Spectrom.* 2003. 38 (12): 1225-1237.

- Imido ésteres. El grupo funcional de imidato es uno de los grupos acilantes más específicos en la modificación de aminas primarias. Al contrario que otros agentes de “cross-linking”, los agentes que contienen imido ésteres poseen una reactividad cruzada mínima hacia otros nucleófilos. Su pH de funcionamiento es óptimo entre 8 y 9, pero el puente de amida que se forma es susceptible de hidrólisis. Son grupos funcionales solubles en agua, pero con una vida media inferior a los treinta minutos.
- Carbodiimidas. Son agentes “zero-length”, usados para mediar la formación de puentes de amida entre un carboxilato o un fosfato y un grupo amino.

Agentes con grupos sulfidrilo-reactivos. Son el segundo tipo de grupo funcional más común, especialmente en el diseño de agentes heterobifuncionales, en donde los grupos sulfidrilo se encuentran frecuentemente en uno de los dos

sitios reactivos. Las reacciones primarias llevadas a cabo por estos grupos son principalmente la alquilación y el intercambio de disulfidos.

- Maleimidas. Las imidas de ácido maleico se usan frecuentemente en los agentes de “cross-linking” heterobifuncionales. Las reacciones que median son específicas, y a pH 7 ocurre mil veces más rápido con sulfidrilos que con aminas. Pueden, asimismo, sufrir hidrólisis a pH elevados.

Agentes con grupos fotorreactivos. Los grupos fotorreactivos presentan la posibilidad de ser inducidos a reaccionar con moléculas diana mediante su exposición a radiación ultravioleta. Durante el tiempo en que esta exposición no se produce, son relativamente no reactivos. Estos grupos suelen utilizarse en experimentos cuyas condiciones pueden ser muy controladas. El grupo fotorreactivo por excelencia es el aril azida. El tipo de reacción que llevan a cabo estos agentes puede observarse en la **Figura 16**.

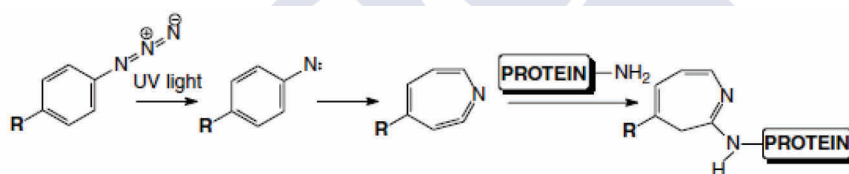


Figura 16. Reacción de “cross-linking” de un grupo funcional fotorreactivo. Fuente: Sinz A. *J Mass Spectrom.* 2003. 38 (12): 1225-1237.

Elección de un agente de “cross-linking”. La elección de un tipo de agente de “cross-linking” u otro depende en gran medida de la muestra a estudiar y de sus características, así como de las características del agente en cuestión. Por norma general, un agente de “cross-linking” debe ser estable, reactivo, suficientemente soluble, fácil de usar y barato. La longitud del brazo espaciador no debe exceder un cierto tamaño, puesto que la interacción entre proteínas suele darse en distancias relativamente pequeñas.

Reacción de “cross-linking”. La reacción de “cross-linking” genera, por lo general, una amplia variedad de productos, entre los cuales se incluyen péptidos

modificados con un agente de “cross-linking” hidrolizado, un agente de “cross-linking” uniendo grupos funcionales de un mismo péptido, o uniendo grupos funcionales de dos cadenas polipeptídicas diferentes.

La nomenclatura de estos productos depende de los autores. Se les llama “cross-links”, “loop-links” o “mono-links” en algunos casos⁸⁸, o bien “dead end”, “intrapeptide” o “interpeptide” en otros. Ambas nomenclaturas, así como un esquema gráfico de los productos, se muestra en la **Figura 17**.

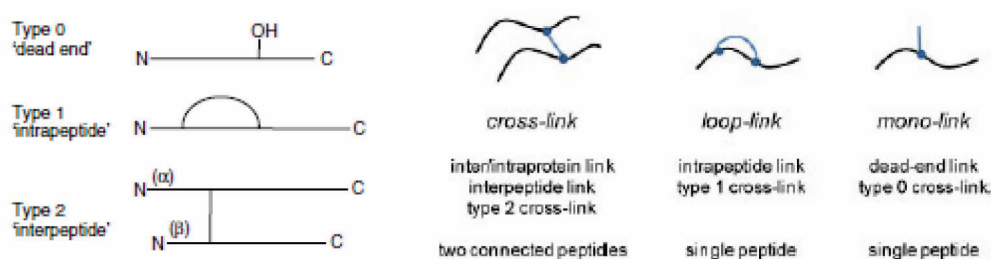


Figura 17. Tipo de productos de una reacción de “cross-linking”. Fuente: Leitner A et al. *Mol Cell Proteomics*. 2010. 9 (8): 1634-49. doi: 10.1074/mcp.R000001-MCP201.

Debido a esta diversidad de productos de reacción, uno de los principales inconvenientes que presenta el “cross-linking” es la identificación de dichos productos. En un intento de facilitar esta tarea, se han utilizado diversas estrategias, como añadir isótopos a los agentes de “cross-linking” o a las proteínas, marcar los agentes con fluorescencia, utilizar agentes con sitios de escisión, con marcadores iónicos para MS/MS o mediante etiquetas de afinidad⁸⁹.

A pesar de que la resolución de la cristalografía de rayos X y NMR es mayor que la del “cross-linking”, la versatilidad de esta última ha hecho que se convierta en una técnica ampliamente utilizada. Además, en los últimos años, la combinación del “cross-linking” con técnicas electroforéticas o de purificación y con

⁸⁸Leitner A, Walzthoeni T, Kahraman A, Herzog F, Rinner O, Beck M, Aebersold R. Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry, and bioinformatics. *Mol Cell Proteomics*. 2010. 9: 1634-49. doi: 10.1074/mcp.R000001-MCP201.

⁸⁹Sinz A. Investigation of protein-protein interactions in living cells by chemical crosslinking and mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2010. 397: 3433-3440.

espectrometría de masas^{90, 91} ha convertido esta estrategia experimental en una de las mejores para estudiar las interacciones proteicas (**Figura 18**).

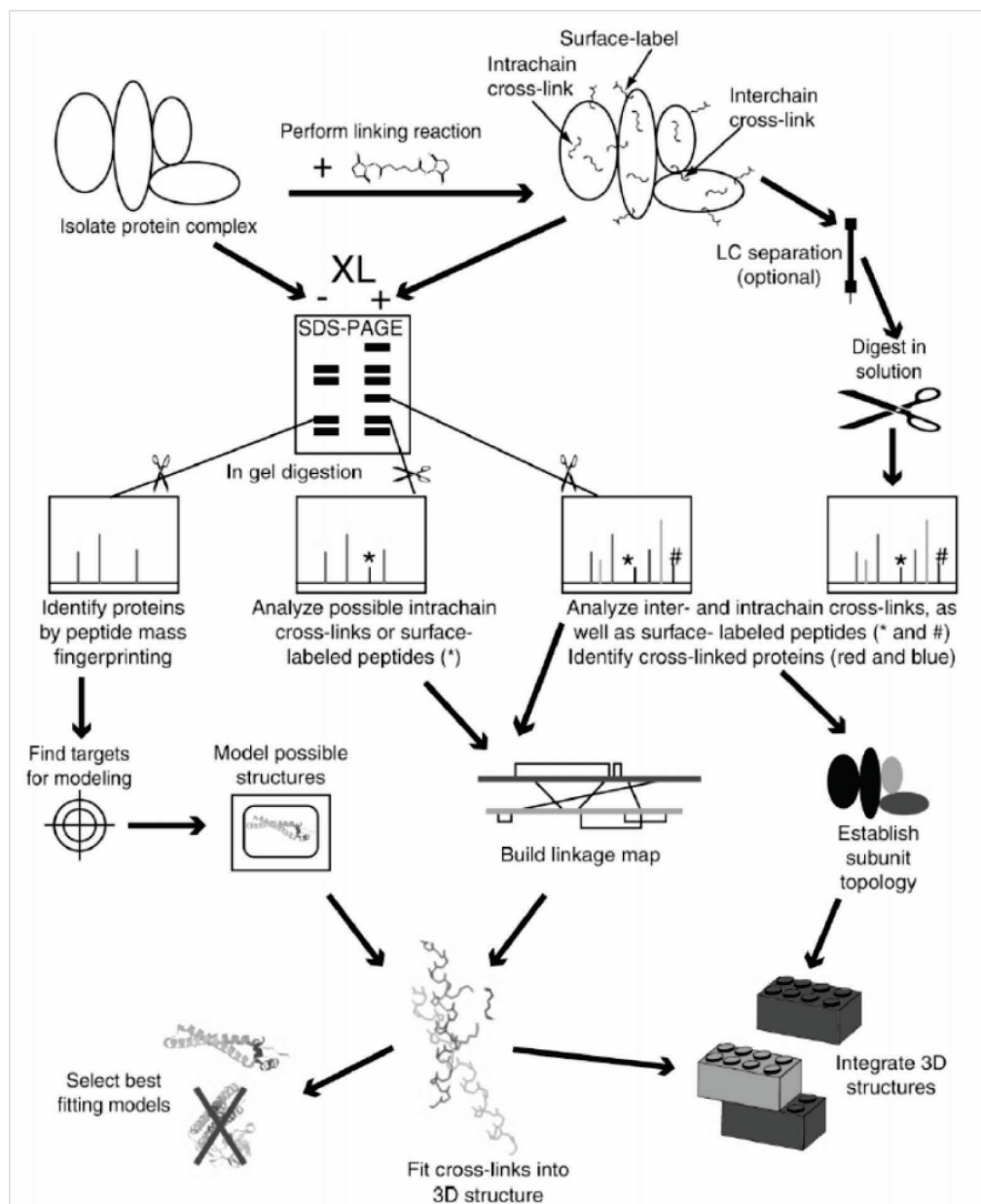


Figura 18. Ejemplo de un esquema experimental en donde se asocia “cross-linking”, electroforesis y espectrometría de masas. Fuente: Back JW et al. *J Mol Biol.* 2003. 331 (2): 303-313.

⁹⁰Back JW, de Jong L, Muijsers AO, de Koster CG. Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling. *J Mol Biol.* 2003. 331: 303-313.

⁹¹Stengel F, Aebersold R, Robinson CV. Joining forces: integrating proteomics and cross-linking with the mass spectrometry of intact complexes. *Mol Cell Proteomics.* 2012. 11: R111.014027. doi: 10.1074/mcp.R111.014027.

En este trabajo, se han utilizado dos tipos de agentes de “cross-linking”: el formaldehído y el Sulfo-SBED.

Formaldehído. El formaldehído es una pequeña molécula bipolar formada por dos átomos de hidrógeno, un carbono y un oxígeno (**Figura 19**). Es el aldehído más pequeño posible, y fue descubierto en el siglo XIX⁹². Sus características le han convertido desde hace décadas en el agente de “cross-linking” por excelencia: es barato, y puede unir residuos aminoácidos separados por una distancia muy pequeña, entre 2.3 y 2.7 Å. Además, la reacción de “cross-linking” que lleva a cabo es reversible, y su pequeño tamaño le permite penetrar paredes celulares y membranas. Puede llevar a cabo reacciones de “cross-linking” tanto entre proteínas como entre DNA/RNA y proteínas.

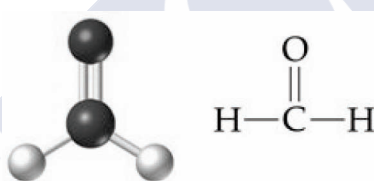


Figura 19. Representación de una molécula de formaldehído.

El núcleo de la molécula, como puede observarse en la **Figura 19**, es un átomo de carbono que actúa como nucleófilo. La molécula en su conjunto presenta una alta afinidad por los grupos nucleofílicos, como es el caso de los grupos amino terminales de los residuos aminoácidos, o en sus cadenas laterales, e interacciona muy rápidamente con ellos, especialmente en el caso de lisinas, argininas e histidinas, aunque también sobre otros residuos. Algún estudio, de hecho, incide en el hecho de que cuanto mayor sea el tiempo de interacción, sobre una mayor variedad de residuos se llevará a cabo la reacción. La elevada velocidad de reacción también es ventajosa para estabilizar interacciones fugaces, y especialmente útil en experimentos de naturaleza histológica.

⁹²Klockenbusch C, O'Hara JE, Kast J. Advancing formaldehyde cross-linking towards quantitative proteomic applications. *Anal Bioanal Chem.* 2012. 404: 1057-1067.

La primera parte de la reacción da lugar a un aducto metilol que se deshidrata rápidamente y genera un producto intermediario formado por la proteína y el formaldehído, denominado base de Schiff. Esta se origina por creación de un enlace covalente entre uno de los grupos funcionales del formaldehído y un residuo aminoacídico próximo. A continuación, el restante grupo funcional del formaldehído reacciona con otro residuo aminoacídico cercano, asegurando, de existir, la interacción entre ambas proteínas.

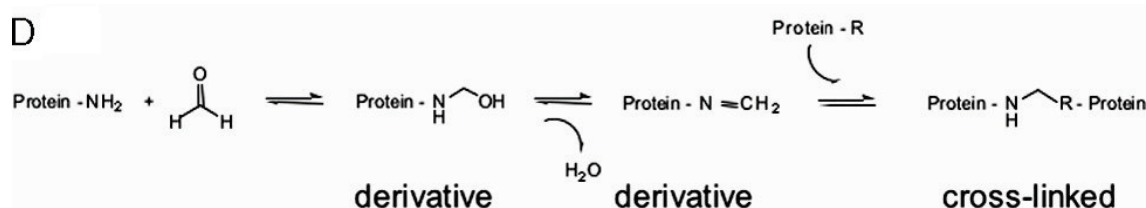


Figura 20. Representación esquemática de la reacción de “cross-linking” llevada a cabo por el formaldehído. Fuente: Sutherland BW et al. *J Mass Spectrom.* 2008. 43 (6): 699-715.

Como ocurre con todos los agentes de “cross-linking”, el formaldehído puede generar una variedad de productos de la reacción. Esto puede limitarse con la duración de la incubación. Durante los diez primeros minutos, los principales grupos funcionales sobre los que actúa el formaldehído son la lisina, el triptófano y los extremos N-terminal de las proteínas. El exceso de tiempo de incubación se relaciona con un grado creciente de pérdida de proteínas, y con la generación de productos de reacción no deseados⁹³.

Una de las ventajas intrínsecas de este agente de “cross-linking”, la longitud de su brazo espaciador, es también una desventaja, puesto que le permite realizar reacciones de “cross-linking” exclusivamente entre residuos de cadenas polipeptídicas que se encuentren muy próximas entre sí. Esta alta especificidad, dependiendo del caso concreto, puede convertirse en una limitación. Además, al contar con solamente cuatro átomos, el formaldehído no puede admitir la inclusión de características adicionales, como grupos de afinidad, o brazos espaciadores de diferente longitud. Por otro lado, se presupone que el formaldehído no afecta la

⁹³Sutherland BW, Toews J, Kast J. Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom.* 2008. 43: 699-715.

estructura secundaria y terciaria de las proteínas, pero es posible que el tratamiento altere de alguna forma la estructura proteica aunque esta alteración no haya sido detectada experimentalmente.

Sulfo-SBED. El sulfo-N-hidroxisuccinimidil-2-(6-biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido) etil-1,3-ditiopropionato, conocido bajo el nombre de Sulfo-SBED (**Figura 21**), es un agente de “cross-linking” químico heterobifuncional recientemente desarrollado (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Su reacción de “cross-linking” incluye dos pasos. En el primero, el grupo funcional éster NHS de un extremo de la molécula se une a un grupo amino en un residuo aminoacídico de una proteína (**Figura 22**). El intermedio y la proteína Y se mezclan y se someten a la acción de luz UV. Esta va a hacer que el grupo aril azida cambie de conformación, doblando la molécula y permitiendo el acercamiento de ambas proteínas. La reacción termina con las dos proteínas unidas por el agente de “cross-linking”. Posteriormente, este producto podrá ser sometido a otros tratamientos experimentales, con el objetivo de identificar y caracterizar esta interacción.

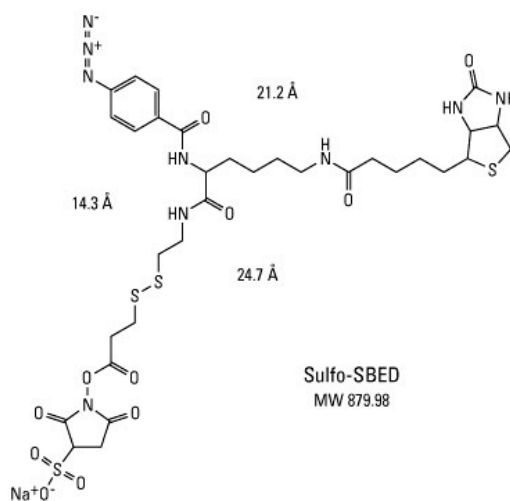


Figura 21. Representación esquemática de una molécula de Sulfo-SBED.

Para realizar su función, la molécula incluye varios elementos adicionales que mejoran su resolución. El grupo aril azida, como hemos visto, permite definir

el momento exacto en el que se desea finalizar la reacción de “cross-linking”, algo crucial en determinados experimentos. Por otro lado, la molécula incluye un puente disulfuro, cuya reducción permitirá que se libere la proteína Y. La molécula de biotina que está unida al Sulfo-SBED se va ‘arrastrada’ por la proteína Y, permitiendo su detección posterior por “Western-blotting” o su purificación en una columna de afinidad.

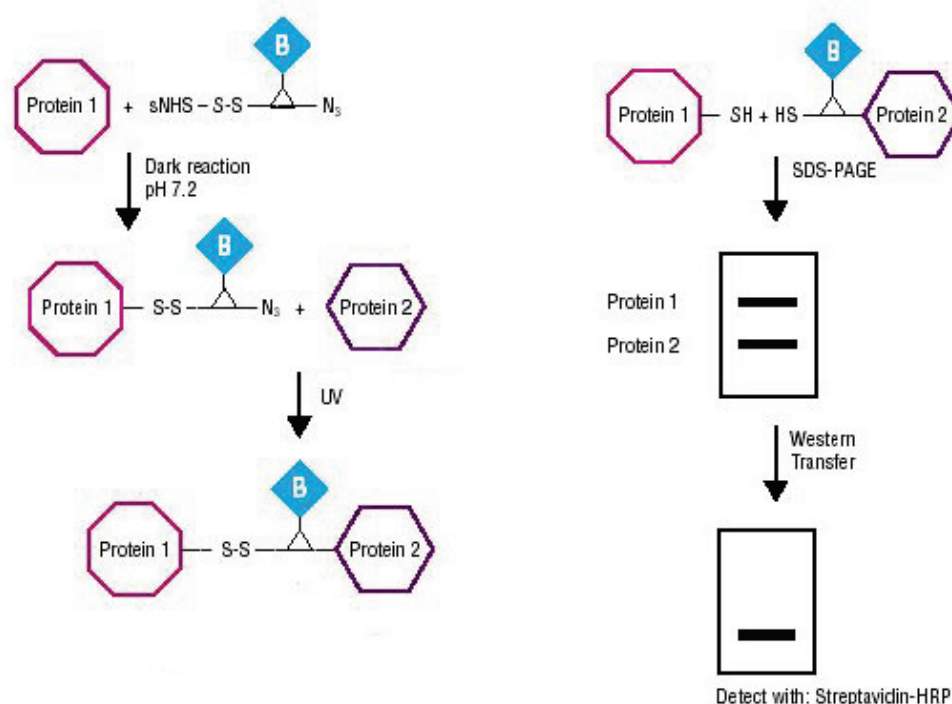


Figura 22. Representación esquemática de la reacción de cross-linking llevada a cabo por el Sulfo-SBED.

2.3. Espectrometría de masas

2.3.1. Introducción

La espectrometría de masas es un conjunto de técnicas microanalíticas cuyo origen se remonta al siglo XIX, y que se utiliza de forma selectiva en la detección y determinación de la cantidad de un compuesto en una muestra, así como para la determinación de su composición y otras características estructurales. Se trata por tanto de un conjunto de técnicas que pueden ser tanto cuantitativas como cualitativas.

La información que se genera es una medida experimental de la masa de los iones producidos a partir de la muestra a analizar, compuestos químicos ionizados, a los cuales se les mide su ratio masa/carga (m/z). Dichos iones, al tratarse de partículas cargadas, son susceptibles de verse afectados por campos eléctricos y magnéticos, y por tanto, su posición en el espacio puede ser manipulada. También se los puede agrupar y mover, aunque para ello deben encontrarse en el vacío y en fase gaseosa. En estas condiciones, los iones no pueden colisionar con ninguna otra forma de materia, y pueden ser analizados de forma individualizada⁹⁴.

La espectrometría de masas no es una técnica limitada a compuestos orgánicos e inorgánicos, sino que puede ser utilizada sobre cualquier molécula ionizable, incluyendo en este grupo a moléculas biológicas de interés como proteínas, DNA, carbohidratos, etc. Su asociación con técnicas electroforéticas se produce desde hace décadas cada vez con mejores resultados⁹⁵.

El equipo que realiza los análisis de espectrometría de masas se denomina espectrómetro de masas, y la información obtenida a partir de las mediciones, espectro de masas. El procedimiento llevado a cabo por el espectrómetro de masas consta, de forma general, de varios pasos. Primero, la muestra a analizar se carga en el espectrómetro de masas, y es vaporizada. A continuación, las muestras vaporizadas son ionizadas, y separadas en el analizador de acuerdo a su ratio m/z

⁹⁴**Throck Watson J, David Sparkman O.** Introduction to mass spectrometry (4th Edition).2007. Wiley. England.

⁹⁵**Thelen JJ, Miernyk JÁ.** The proteomic future: where mass spectrometry should be taking us. *Biochem J.* 2012. 444: 169-181.

mediante campos magnéticos o eléctricos, y finalmente, las moléculas así separadas son detectadas, y la señal se procesa generando un espectro de masas.

Por tanto, el espectrómetro de masas presenta varios módulos principales, representados esquemáticamente en la **Figura 23**:

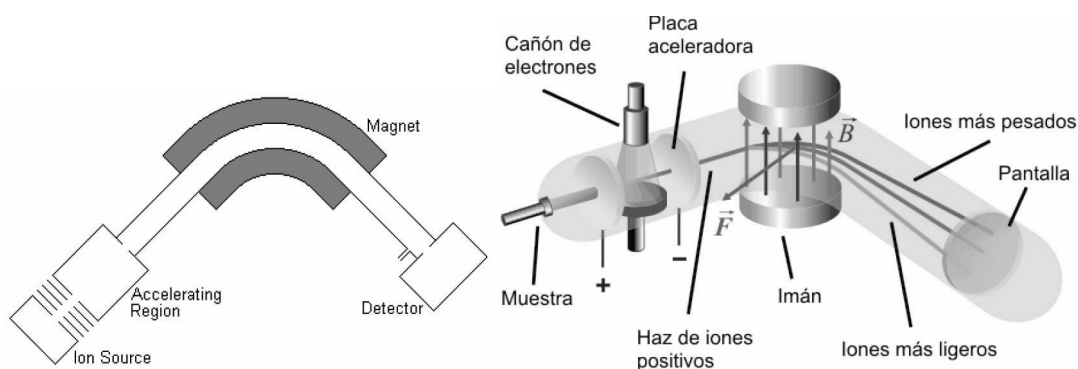


Figura 23. Representación esquemática de los módulos de un espectrómetro de masas.

- La fuente de ionización, encargada de ionizar las moléculas de la muestra.
- El analizador de masas, que acelera las moléculas y las separa en función de su m/z .
- El detector, que mide cuantitativamente el proceso, generando la información relativa a cada ión, su espectro de masas (**Figura 24**).

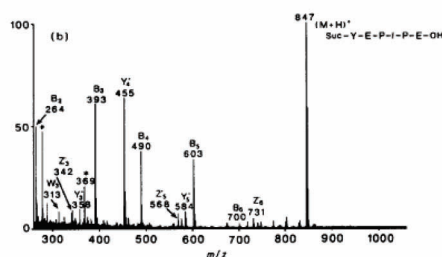


Figura 24. Ejemplo de espectro de masas.

Ionización. La fuente de ionización es la parte del espectrómetro de masas que ioniza la muestra, un punto clave para el análisis espectral. En el caso de muestras sólidas o líquidas, estas técnicas pueden ser reducidas a dos principales:

1. Ionización por electrospray ("ElectroSpray Ionization")⁹⁶. Técnica especialmente útil cuando la muestra está constituida por macromoléculas, puesto que reduce la tendencia de las mismas a fragmentarse al ser ionizadas. Se aplica, entre otras técnicas, en la LC-MS/MS, una variante de la espectrometría de masas muy utilizada y en la que se profundizará en una sección posterior.
2. Ionización/desorción mediante láser en matriz (MALDI)⁹⁵, técnica de ionización suave que permite el análisis de biomoléculas como proteínas y DNA, y moléculas orgánicas grandes. La desorción se lleva a cabo mediante un haz láser de rayos UV, y el material que forma la matriz en donde se encuentra embebida la muestra absorbe dicha radiación. Esto provoca la ablación de parte del material de la matriz, generando moléculas de matriz ionizadas, neutras, protonadas, desprotonadas, fragmentos mayores y nanogotas. Esta matriz puede estar formada por diferentes compuestos, frecuentemente α -HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico), ácido sinápico, MBT (2-mercaptobenzotiazol), PA (ácido picolínico), HPA (ácido 3-hidroxipicolínico), etc. El segundo paso, tras la desorción, es la ionización propiamente dicha.

Analizador. El analizador de masas es el módulo del espectrómetro de masas encargado de acelerar las moléculas ionizadas y separarlas de acuerdo a su valor m/z . Esta aceleración puede generarse mediante campos eléctricos o magnéticos, los cuales pueden ser, a su vez, dinámicos o estáticos, y que funcionan necesariamente en el vacío.

Las moléculas ionizadas presentan la misma carga, de modo que las energías cinéticas serán idénticas y la velocidad a la que avanzan por el tubo de vacío depende únicamente de su masa. Así, los iones más ligeros alcanzan el detector antes que los más pesados.

⁹⁶Wilm M. Principles of electrospray ionization. *Mol Cell Proteomics*. 2011. 10: M111.009407.

Existen diferentes tipos de analizadores utilizados en espectrometría de masas:

1. TOF (“Time-of-flight”). Los espectrómetros de masas con analizador TOF miden el tiempo que tarda cada ión en alcanzar el detector, con la ventaja de que carece de límite superior de valor m/z . Una modalidad del TOF es el TOF con “reflectron” o “curved-field reflectron”⁹⁷. En dicha modalidad, se aumenta el poder de resolución de la técnica utilizando un espejo de iones que refleja las moléculas ionizadas, mediante la generación de un campo eléctrico de mayor energía que el inicial. Las moléculas ionizadas con mayor energía penetran más en dicho campo eléctrico, y adquieren mayor energía cinética que los de menor energía. El tiempo de vuelo se alarga y la resolución se incrementa.
2. Trampa iónica. Se caracteriza principalmente porque tanto la ionización como la separación y la detección se realizan en el mismo espacio, de forma secuencial en el tiempo. Utiliza electrodos hiperbólicos. Una vez las moléculas alcanzan la trampa, son ionizadas y fragmentadas, y los iones retenidos o expulsados en función de su valor m/z .
3. “Quadrupole”. Variedad de trampa iónica en el que se utiliza una corriente directa y radiofrecuencia oscilando en un campo eléctrico AC para atrapar iones.
4. “Orbitrap”. En este caso, los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos, y se quedan atrapados debido a que la atracción electrostática hacia el electrodo interior se equilibra con fuerzas centrífugas. Los iones, por tanto, dan vueltas alrededor de dicho electrodo central, agrupados en relación a su valor m/z específico. Esto hace que el “Orbitrap”⁹⁸ presente una resolución y precisión altas.
5. FTICR (“Fourier transform ion cyclotron resonance”). Esta variante determina el valor m/z de las partículas ionizadas basándose en la

⁹⁷Cotter RJ, Griffith W, Jelinek C. Tandem time-of-flight (TOF/TOF) mass spectrometry and the curved-field reflectron. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007. 855: 2-13.

⁹⁸Perry RH, Cooks RG, Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom Rev.* 2008. 27: 661-699.

frecuencia del ciclotrón de dichas partículas fijadas a un campo magnético determinado⁹⁹.

Detector. La tercera sección del espectrómetro de masas es el detector, encargado de detectar la partícula ionizada y medir el tiempo que ha tardado en llegar desde que ha sido ionizada. La señal que se obtiene de este proceso se traduce como un espectro de masas.

Existen numerosos tipos de detectores, como la copa Faraday, el multiplicador electrónico, el detector negativo de iones, el CEMA, los detectores criogénicos, etc, y es una práctica habitual utilizar amplificadores. La razón para ello es que el número de moléculas ionizadas de la muestra suele ser pequeño, y la amplificación necesaria para lograr una señal significativa.

2.3.2. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS)¹⁰⁰ se define como una concatenación de dos espectrometrías de masas con algún tipo de proceso de fragmentación entre ambas. La separación de estas dos espectrometrías de masas puede ser de tipo físico ("Tandem in space") o de tipo temporal ("Tandem in time").

La espectrometría de masas en tándem permite realizar diversos tipos de experimentos, como análisis de productos iónicos, de precursores iónicos, así como análisis de pérdida neutral. Existe una amplia variedad de técnicas de espectrometría de masas en tándem, entre ellas la espectrometría de masas de triple cuadrupole, la espectrometría de masas Q-TOF híbrida, la espectrometría de masas TOF/TOF (de la que se hablará en el apartado siguiente como parte de la técnica MALDI-TOF/TOF), la espectrometría de masas BEqQ híbrido, la LC-MS/MS (Figura 25), etc.

⁹⁹Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom Rev.* 1998. 17: 1-35.

¹⁰⁰Barrier M, Mirkes PE. Proteomics in developmental toxicology. *Reprod Toxicol.* 2005. 19: 291-304.

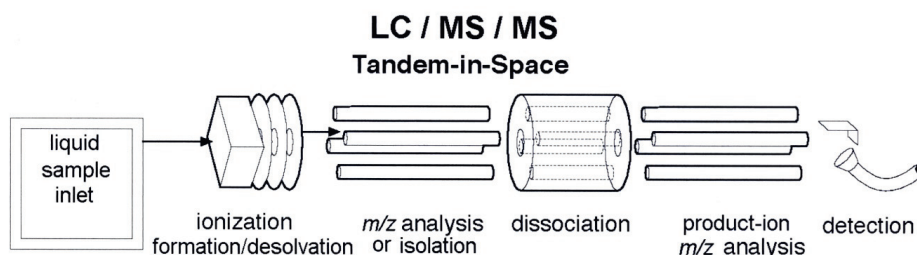


Figura 25. Representación esquemática de la técnica de espectrometría de masas en tándem LC-MS/MS. Fuente: Throck Watson J, David Sparkman O. Introduction to mass spectrometry (4th Edition).2007. Wiley. England.

La espectrometría de masas es un campo de estudio muy amplio y en continuo avance, en el cual no dejan de publicarse nuevos estudios y generarse conocimientos. Debido a la vastedad de los mismos, se ha decidido profundizar única y exclusivamente en las técnicas específicas utilizadas durante los experimentos llevados a cabo y descritos en este trabajo. Esto incluye al MALDI-TOF/TOF y a la nanoLC-MS/MS.

MALDI-TOF/TOF ("Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization")-(*"Time-of-flight/Time-of-flight"*)¹⁰¹ es una técnica de espectrometría de masas que utiliza una matriz durante el proceso de ionización de la muestra. Como se ha dicho en los apartados anteriores, esta matriz puede estar formada por diversos materiales, pero en el caso concreto del análisis de nuestras muestras, el compuesto de la matriz fue el ácido α -ciano-4-hidroxi cinnámico (4-HCCA). Además de dicha matriz, esta técnica utiliza un analizador de masas TOF (*"Time-of-flight"*) en tándem. Para la grabación del espectro concreto de los precursores iónicos, el TOF/TOF opera en estado MS, lo cual quiere decir que el haz láser de UV se asegura lograr un equilibrio entre el campo iónico para generar todos los iones originales, y la fragmentación de los mismos. En el caso de TOF en tándem, la energía del haz láser es considerablemente mayor. El primer TOF (un tubo de vuelo que termina en un selector de iones) aísla los iones precursores utilizando un filtro de velocidad;

¹⁰¹**Gogichaeva NV, Williams T, Alterman MA.** MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry as a new tool for amino acid analysis. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2007. 18: 279-284.

mientras que el segundo TOF (acelerador, tubo de vuelo, espejo iónico y detector de iones) analiza los fragmentos iónicos generados.

En la **Figura 26** se puede observar el esquema de un espectrómetro de masas que lleva a cabo MALDI-TOF/TOF.

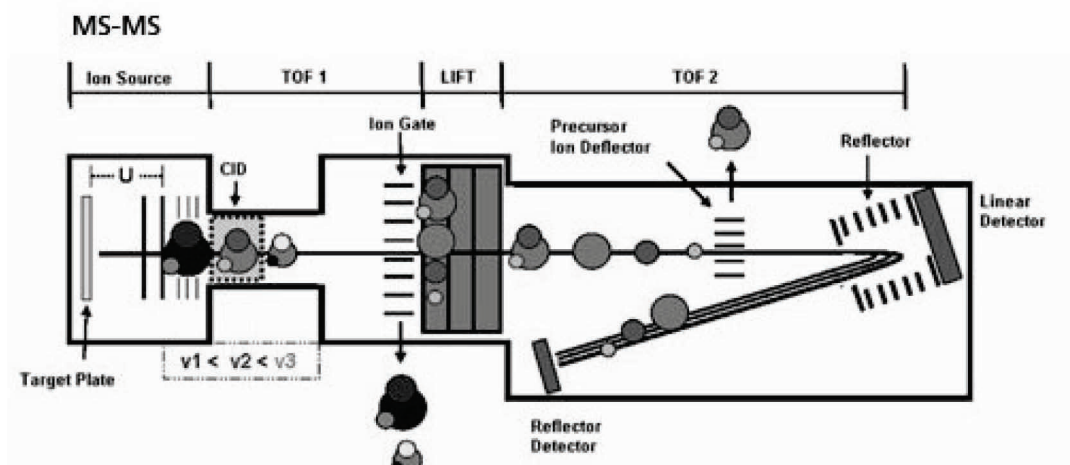


Figura 26. Representación esquemática de la técnica de espectrometría de masas en tándem MALDI-TOF/TOF.

El procedimiento de identificación proteica fue el PMF (“Peptide Mass Fingerprinting”)¹⁰², que consiste en el emparejamiento de los datos del espectro de masas que representa los fragmentos proteolíticos protonados, con los datos de los fragmentos proteicos para la misma proteasa obtenidos de una base de datos (ya sean estos reales o predicciones).

Las especificaciones técnicas del MALDI-TOF/TOF utilizado en este trabajo se detallan en el apartado correspondiente de **Material y métodos**.

LC-MS/MS (“Liquid Chromatography–Mass Spectrometer/Mass Spectrometer”). La LC-MS/MS¹⁰³ es una técnica que combina la capacidad técnica de la cromatografía líquida (HPLC) de separación física con la capacidad de la

¹⁰²Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, Jungblut PR. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005. 35: 237-247.

¹⁰³Abian J. The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 1999. 34: 157-168.

espectrometría de masas de analizar la masa de moléculas ionizadas. La cromatografía líquida es sensible y selectiva, mientras que la espectrometría de masas presenta una alta resolución.

Sin embargo, el acoplamiento de la cromatografía líquida con la espectrometría de masas no resulta precisamente sencillo, debido a la dificultad de conseguir que el flujo de líquido se realice en las condiciones adecuadas. La interfaz entre ambas técnicas es un hándicap, solucionado históricamente con técnicas como el “direct inlet”, “moving-belt interface”, “thermospray interface”, “continuous-flow FAB”, etc, y que actualmente cuenta con tres variantes principales: la interfaz de ionización a presión atmosférica (que incluye la ionización por electrospray, la interfaz APCI y la interfaz APPI), la interfaz “Particle Beam”, y la interfaz de ionización electrónica.

La muestra, por tanto, es sometida a una cromatografía líquida de alta resolución, y sus componentes van a avanzar diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas que se producen con la fase estacionaria a medida que se desplacen por la columna. Posteriormente a esta separación, las moléculas entran en la siguiente sección, el espectrómetro de masas, que en este caso realizará una espectrometría en tándem, ya descrita en el apartado anterior. En la **Figura 27** se puede observar un procedimiento típico LC-MS/MS.

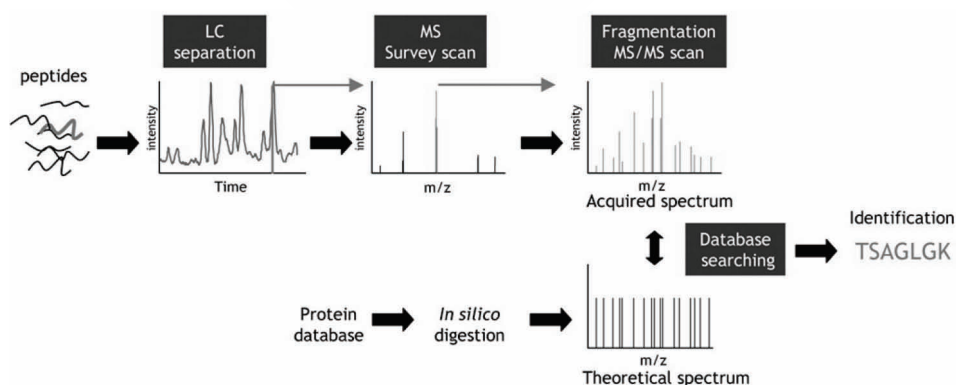


Figura 27. Representación esquemática del procedimiento experimental de la LC-MS/MS.

Las especificaciones concretas de la LC-MS/MS utilizada en este trabajo se detallan en el apartado correspondiente de **Material y métodos**.

3. BACTERIAS OBJETO DE ESTUDIO

En este trabajo se han utilizado tres especies bacterianas diferentes: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Neisseria meningitidis* H44/76. Las dos primeras fueron utilizadas en todo el conjunto del trabajo experimental, mientras que la cepa H44/76 de *N. meningitidis* fue utilizada exclusivamente en los trabajos relacionados con el “cross-linking” químico.

A continuación, cada una de las tres especies bacterianas serán presentadas brevemente.

3.1. *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo Gram-negativo que pertenece al grupo de las Enterobacterias. Habita el tracto intestinal de los animales de sangre caliente, formando parte de su microbiota normal y aportando determinados beneficios al hospedador. A pesar de su papel como parte de la microbiota, también existe una serie de cepas patógenas que causan infección.

Como bacteria comensal, *E. coli* representa el 0,1% de la microbiota intestinal, participando en la nutrición y el metabolismo del hospedador por medio de mecanismos todavía no del todo claros. Por ejemplo, participa con otras bacterias en la producción de la vitamina K¹⁰⁴, y se ha sugerido que podría colonizar el tracto intestinal del feto antes de que se produzca el nacimiento¹⁰⁵. También evita la colonización por parte de otras bacterias patógenas, y la alteración de los niveles normales de *E. coli* y otras bacterias en el tracto intestinal se relaciona con determinadas enfermedades¹⁰⁶.

A pesar del comensalismo predominante en la mayoría de las cepas de *E. coli*, existen algunas que son patógenas para el ser humano. Estas suelen clasificarse en

¹⁰⁴Dairi T. Menaquinone biosyntheses in microorganisms. *Methods Enzymol.* 2012. 515: 107-122. doi: 10.1016/B978-0-12-394290-6.00006-9.

¹⁰⁵Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol.* 2008. 159: 187-193.

¹⁰⁶Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell.* 2012. 148: 1258-1270.

función de los antígenos O, K y H, así como por el tipo de infección que provocan: cepas extraintestinales (ExPEC)¹⁰⁷ o intestinales (EPEC, ETEC, EHEC, EIEC y EAEC)¹⁰⁸. Las infecciones extraintestinales incluyen septicemias, infecciones urinarias y meningitis, y entre las intestinales, las diferentes cepas se diferencian por causar una afectación del intestino delgado o del intestino grueso, la presencia de sangre, fiebre, etc, así como por el mecanismo de virulencia involucrado (plásmidos, toxinas u ambos).

Los factores de virulencia de las cepas patógenas incluyen principalmente exotoxinas y adhesinas¹⁰⁹, así como plásmidos. Entre las cepas que causan infecciones intestinales, la infección es mediada por moléculas de fijación como la intimina (EPEC)¹¹⁰, enterotoxinas termoestables y/o termolábiles (ETEC), las toxinas Shiga (EHEC), etc. En el caso de las infecciones extra-intestinales, destacan las adhesinas, necesarias para resistir el arrastre de la micción, o el antígeno capsular K1, en el caso concreto de las cepas de *E. coli* que causan meningitis en neonatos.

Tanto en las cepas que causan infecciones extra-intestinales como en las intestinales, ocurren fenómenos de resistencia al tratamiento antibiótico, especialmente entre las cepas extra-intestinales. Entre las intestinales, la EPEC y la ETEC causan elevadas resistencias, mientras que la EHEC no suele ser tratada con antibióticos porque estos exacerban la toxicidad de la toxina Shiga^{111, 112, 113}.

Finalmente, *E. coli* es a día de hoy uno de los principales organismos modelo, por diversos motivos: es fácil de mantener en laboratorio, con requerimientos nutricionales mínimos, y se reproduce muy rápidamente en condiciones óptimas.

¹⁰⁷Johnson JR, Kuskowski MA, Smith K, O'Bryan TT, Tatini S. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. *J Infect Dis*. 2005. 191: 1040-1049.

¹⁰⁸MurrayPR, Rosenthal KS, Pfaller MA. En: Capítulo 31: Enterobacteriaceae. Microbiología médica (5ª Ed.). 2006. España. Elsevier Academic Press.

¹⁰⁹Mulvey MA, Hultgren SJ. En: Schaechter M. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2004. USA. Elsevier Academic Press.

¹¹⁰Nougayrède JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol*. 2003. 5: 359-372.

¹¹¹Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* – associated diarrhea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011. 28: 648-656.

¹¹²Da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*. 2012. 3: 18-28.

¹¹³Tomazella GG, Risberg K, Mylvaganam H, Lindemann PC, Thiede B, Souza GA, Wiker HG. Proteomic analysis of a multi-resistant clinical *Escherichia coli* isolate of unknown genomic background. *J Proteomics*. 2012. 75: 1830-1837.

Así, es un organismo de referencia en todos los campos de estudio: su genoma fue uno de los primeros en ser secuenciado, y su proteoma sirve de referencia en numerosas bases de datos¹¹⁴. Incluso se ha utilizado en estudios evolutivos¹¹⁵ y matemáticos, y ha sido catalizadora del auge de la biotecnología y la ingeniería genética. Existe un volumen inmenso de información, y numerosas técnicas y procedimientos son probados primero en *E. coli* antes de aplicarse en otros organismos.

3.2. *Serratia marcescens*

S. marcescens es un bacilo Gram-negativo que pertenece al grupo de las Enterobacterias. Habita de forma ubicua aguas, suelos, animales y plantas, y puede sobrevivir en ambientes nutricionalmente pobres, pero generalmente crece en lugares húmedos, frecuentemente formando biofilms.

Su importancia es creciente, ya que a pesar de su naturaleza generalmente saprófita, *S. marcescens* es un patógeno oportunista, de forma marcada en ambientes hospitalarios, con una presencia significativa en unidades de cuidado intensivo de pacientes neonatales y pediátricos, entre los que causa el 5-15% de infecciones¹¹⁶. La mayor parte de las cepas, sin embargo, no son patógenas, y las infecciones de *S. marcescens* suelen estar causadas por un número reducido de cepas y clones¹¹⁷. Sobrevive en las manos de los trabajadores, así como en superficies y materiales, de modo que la prevención incluye el lavado de manos y desinfección con los productos adecuados. Estas infecciones cursan en forma de septicemia, meningitis¹¹⁸, abscesos cerebrales, infecciones del tracto respiratorio y

¹¹⁴Lee PS, Lee KH. *Escherichia coli*—a model system that benefits from and contributes to the evolution of proteomics. *Biotechnol Bioeng*. 2003. 84: 801-814.

¹¹⁵<http://myxo.css.msu.edu/ecoli/>

¹¹⁶Voelz, A.; Müller, A.; Gillen, J.; Le, C.; Dresbach, T.; Engelhart, S.; Exner, M.; Bates, C. J.; Simon, A. Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: clinical aspects, risk factors and management. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2010. 213: 79-87.

¹¹⁷Villa J, Alba C, Barrado L, Sanz F, Del Castillo EG, Viedma E, Otero JR, Chaves F. Long term evolution of multiple outbreaks of *Serratia marcescens* bacteremia in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 2012. 31: 1298-1300.

¹¹⁸Wu YM, Hsu PC, Yang CC, Chang HJ, Ye JJ, Huang CT, Lee MH. *Serratia marcescens* meningitis: epidemiology, prognostic factors and treatment outcomes. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012.

urinario, conjuntivitis, endocarditis¹¹⁹, fascitis¹²⁰, etc. Siendo un patógeno oportunista en ambientes hospitalarios, el principal factor de riesgo es la inmunosupresión, así como el embarazo, cateterismos, ventilación mecánica y peso del recién nacido.

Los factores de virulencia^{121, 122} incluyen proteasas, nucleasas, lecitinasas y hemolisinas, aunque los mecanismos mediante los cuales funcionan no se conocen demasiado bien. Las cepas patógenas de *S. marcescens* se caracterizan por presentar numerosas resistencias antibióticas, y al afectar a grupos de población tan vulnerables, la limitación en el tratamiento antibiótico podría convertirse en un problema. Es resistente frente a un amplio abanico de antibióticos, especialmente beta-lactámicos¹²³, y también presenta resistencia frente a las fluoroquinolonas¹²⁴, gracias a la presencia de determinadas bombas de eflujo^{125, 126} y mutaciones específicas.

Además de su papel como bacteria patógena oportunista, *S. marcescens* también se caracteriza por presentar un importante metabolismo secundario. Destaca especialmente la producción de un pigmento rojo denominado prodigiosina^{124, 127, 128}, que presenta numerosas actividades biológicas de interés, principalmente en el tratamiento tumoral. Asimismo, *S. marcescens* y otras

¹¹⁹**Hadano Y, Kamiya T, Uenishi N.** A fatal case of infective endocarditis caused by an unusual suspect: *Serratia marcescens*. *Intern Med.* 2012. 51: 1425-1428.

¹²⁰**Vano-Galvan S, Alvarez-Twose I, Moreno-Martín P, Jaén P.** Fulminant necrotizing fasciitis caused by *Serratia marcescens* in an immunosuppressed host. *Int J Dermatol.* 2012. doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.05440.

¹²¹**Rodrigues AP, Holanda AR, Lustosa GP, Lóbrega SM, Santana WJ, Souza LB, Coutinho HD.** Virulence factors and resistance mechanisms of *Serratia marcescens*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2006. 53: 89-93.

¹²²**Barchiesi J, Castelli ME, Di Venanzio G, Colombo MI, García Vescovi E.** The PhoP/PhoQ system and its role in *Serratia marcescens* pathogenesis. *J Bacteriol.* 2012. 194: 2949-2961.

¹²³**Foglia EE, Fraser VJ, Elward AM.** Effect of nosocomial infections due to antibiotic-resistant organisms on length of stay and mortality in the pediatric intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 28: 299-306.

¹²⁴**Chang CC, Chen WC, Ho TF, Wu HS, Wei YH.** Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *J Biosci Bioeng.* 2011. 111: 501-511.

¹²⁵**Dalvi SD, Worobec EA.** Gene expression analysis of the SdeAB multidrug efflux pump in antibiotic-resistant clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Indian J Med Microbiol.* 2012. 30:302-307.

¹²⁶**Chen J, Kuroda T, Huda MN, Mizushima T, Tsuchiya T.** An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother.* 2003. 52: 176-179.

¹²⁷**Dalili D, Fouladdel S, Rastkari N, Samadi N, Ahmadvaniha R, Ardavan A, Azizi E.** Prodigiosin, the red pigment of *Serratia marcescens*, shows cytotoxic effects and apoptosis induction in HT-29 and T47D cancer cell lines. *Nat Prod Res.* 2011. 26: 2078-2083.

¹²⁸**Pandey R, Chander R, Sainis KB.** Prodigiosins: a novel family of immunosuppressants with anti-cancer activity. *Indian J Biochem Biophys.* 2007. 44: 295-302.

especies del género *Serratia* son referencia de estudio en el campo del quórum sensing, puesto que sus AHL son fenotípicamente muy variables en *S. marcescens*¹²⁹. El quórum sensing, entre otras funciones, parece regular los factores de virulencia, la formación de biofilm, y se está valorando la posibilidad de utilizar su inhibición como tratamiento¹³⁰.

3.3. *Neisseria meningitis*

N. meningitidis es una bacteria Gram-negativa que se asocia formando diplococos, y que coloniza la nasofaringe humana, su único reservorio conocido. Su relación con el hospedador es, por tanto, de comensalismo obligado, pero también puede causar enfermedad. En la mayor parte de ocasiones, sin embargo, el huésped no desarrolla enfermedad y es simplemente un portador asintomático. El diplococo se transmite por las secreciones de las vías respiratorias y en contactos cercanos con portadores, estableciéndose en la mucosa nasofaríngea. Ocasionalmente, *N. meningitidis* puede atravesar las membranas de las mucosas y acceder al torrente sanguíneo, en donde crece, para luego atravesar las meninges y provocar una inflamación debido a los factores de virulencia. Así, la infección por *N. meningitidis* puede manifestarse en forma de meningitis, meningoencefalitis, meningococemia, neumonía, artritis séptica, y otras formas menos importantes. En Europa, la mortalidad ronda el 6-8 %¹³¹, y es común que entre los supervivientes se presenten secuelas permanentes de menor o mayor gravedad.

En función de las características de su cubierta polisacáridica, se diferencian trece serogrupos diferentes, aunque solamente seis de ellos presentan un potencial patológico significativo: A, B, C, W135, Y y el más reciente, X¹³². Prácticamente todas las cepas aisladas de pacientes presentan cápsula polisacáridica. *N.*

¹²⁹Van Houdt R, Givskov M, Michiels CW. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol Rev.* 2007. 31: 407-424.

¹³⁰Bakkiyaraj D, Sivasankar C, Pandian SK. Inhibition of quorum sensing regulated biofilm formation in *Serratia marcescens* causing nosocomial infections. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012. 22: 3089-3094.

¹³¹Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine.* 2009. 27: B51-63. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.063.

¹³²Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I, Maïnassara HB, Tenebray B, Kairo KK, Giorgini D, Chanteau S. Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. *Clin Infect Dis.* 2007. 44: 657-663.

meningitidis también se clasifica en función de la reactividad inmunológica de sus proteínas mayoritarias de membrana externa, PorA y PorB¹³³, así como de su lipooligosacárido (LOS)¹³⁴. Los serogrupos principales muestran diferencias en la distribución mundial y comportamiento epidemiológico. El serogrupo A se focaliza en el África subsahariana, y causa epidemias cada ocho o diez años, mientras que en Europa y Estados Unidos apenas es responsable del 0.3% de los casos. El serogrupo B, utilizado en un apartado de este trabajo, es el principal responsable de la enfermedad meningocócica en los países desarrollados, puesto que supone el 90% de los casos esporádicos en algunos países europeos, y el 50% de los casos de Estados Unidos. Sus epidemias transcurren con mayor lentitud y se asocian a cepas hipervirulentas¹³⁵. El otro serogrupo principal, el C, presentaba una amplia presencia en Europa y Norteamérica antes de la introducción de su vacuna conjugada correspondiente.

N. meningitidis presenta una elevada variabilidad antigénica, lo cual favorece la evasión de la respuesta inmune y es, por tanto, un obstáculo importante en el desarrollo de vacunas¹³⁶. Esta variabilidad antigénica se obtiene mediante diversos mecanismos, como el “capsular switching”¹³⁷, que se da, entre otras proteínas, en la PorA y PorB¹³⁸.

La colonización del huésped, la entrada en la circulación sistémica y la producción de la enfermedad se produce mediante la interacción con diferentes tipos celulares, mediante adhesinas como los Pili tipo IV y proteínas de membrana externa como Opa y Opc¹³⁹, en mayor medida, así como otras proteínas implicadas

¹³³Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis*. 1985. 7: 504-510.

¹³⁴Scholten RJ, Kuipers B, Valkenburg HA, Dankert J, Zollinger WD, Poolman JT. Lipooligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *J Med Microbiol*. 1994. 41: 236-243.

¹³⁵Caugant DA, Frøholm LO, Bøvre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LF, Zollinger WD, Selander RK. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986. 83: 4927-4931.

¹³⁶Billker O, Gödert S, Meyer TF. Interactions of *Neisseria meningitidis* with the immune system. En: Ferreirós CM, Criado MT, Vázquez J. (Eds.) *Emerging Strategies In The Fight Against Meningitis: Molecular and Cellular Aspects*. 2002; Reino Unido: Horizon Scientific Press.

¹³⁷Swatley JS, Marfin AA, Edupugantu S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS. Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997. 94: 271-276

¹³⁸Beddek AJ, Li MS, Kroll JS, Jordan TW, Martin DR. Evidence for capsule switching between carried and disease-causing *Neisseria meningitidis* strains. *Infect Immun*. 2009. 77: 2989-2994.

¹³⁹Virji M. Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol*. 2009.7: 274-286.

como NhhA, App, HrpA, NadA y MspA, etc¹⁴⁰. La internalización, transcitosis, supervivencia intracelular y diseminación por el torrente sanguíneo están menos estudiados¹⁴¹.

Actualmente sigue desarrollándose una intensa actividad investigadora en la búsqueda de vacunas, especialmente en el caso de una vacuna global frente a la meningitis B.



¹⁴⁰**Carbonnelle E, Hill DJ, Morand P, Griffiths NJ, Bourdoulous S, Murillo I, Nassif X, Virji M.** Meningococcal interactions with the host. *Vaccine*. 2009. 27: 78-89.

¹⁴¹**Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P.** Epidemic meningitis, meningococcemia and *Neisseria meningitidis*. *Lancet*. 2007. 369: 2196-2210.



OBJETIVOS E INTERÉS DEL TRABAJO

En las últimas décadas, han sido analizadas numerosas fracciones de proteomas bacterianos y proteomas completos. El siguiente paso lógico a la identificación de los componentes detectados es la comprensión de los procesos funcionales en los que participan, puesto que en la mayoría de los casos, una proteína forma parte de un complejo proteico cuya función viene determinada por la interacción de sus componentes. Por tanto, la comprensión de estos procesos funcionales debería basarse, en gran medida, en la comprensión del complexoma celular, los miembros que lo forman y sus características particulares.

En este trabajo, por tanto, se ha planteado el análisis del complexoma de la envuelta celular de bacterias Gram-negativas, puesto que un elevado número de funciones celulares ocurren en las diferentes localizaciones subcelulares comprendidas en dicha envuelta. Una de las bacterias analizadas, *Escherichia coli*, es uno de los organismos más estudiados por la ciencia, con un volumen amplísimo de conocimientos disponibles. *E. coli* constituye un importante organismo modelo, y numerosas técnicas son testadas en esta bacteria previamente a ser utilizadas con otras especies, de modo que constituye un marco de referencia y de comparación muy adecuado. La segunda especie bacteriana analizada, *Serratia marcescens*, es una bacteria saprófita, que como patógena oportunista se ha convertido en un problema clínico, dada su incidencia creciente en unidades hospitalarias neonatales y pediátricas. Asimismo, presenta un importante metabolismo secundario, con potenciales aplicaciones clínicas y biotecnológicas que ya están siendo exploradas. Finalmente, la tercera de las especies bacterianas utilizadas en este trabajo, el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*, es el patógeno responsable de la meningitis de tipo B, para la cual sigue sin existir una vacuna universal efectiva, a pesar de los esfuerzos dedicados en su búsqueda. Sus componentes de envuelta celular han sido extensivamente estudiados con el objetivo de encontrar algún componente que pudiera ser utilizado como antígeno vacunal, y por lo tanto, también representa un modelo comparativo adecuado.

El análisis de los complexomas no solamente permite conocer las proteínas que conforman los complejos proteicos en las diferentes localizaciones (membrana externa, membrana interna, periplasma), sino también detectar proteínas previamente no identificadas por técnicas electroforéticas convencionales. En

relación a ello, la hrCNE es una técnica electroforética nativa que permite la separación de complejos proteicos de membrana evitando en la medida de lo posible la disociación de sus componentes, mediante el uso de detergentes iónicos y no iónicos, lo cual facilita su análisis a pesar de las dificultades derivadas de su hidrofobicidad. La combinación de esta técnica con otras de propiedades desnaturizantes, permiten la detección e identificación de los componentes de los complejos proteicos. La hrCNE, además, es compatible con ensayos de inmunodetección posteriores, como el “Western-blotting”, que también facilitan la detección de componentes minoritarios. De tal modo, la combinación de la hrCNE con otras técnicas de análisis de interacciones proteicas, como el “cross-linking”, podría permitir la estabilización de complejos proteicos de interacción débil y su posterior detección. Estos agentes de “cross-linking” presentan dos extremos que se unen a proteínas que están interactuando, y previenen su disociación. Algunos, además, incluyen componentes adicionales que aumentan su capacidad de detección.

Los objetivos globales planteados en este trabajo son, por tanto, el estudio del complexoma de la envuelta celular de *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Neisseria meningitidis*, con la caracterización de sus complejos proteicos, así como la puesta a punto de un procedimiento experimental combinado del “cross-linking” químico y la hrCNE.

Para ello, los objetivos concretos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Optimización y desarrollo de la hrCNE en el estudio de los complejos proteicos de envuelta celular de *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*.
2. Optimización y desarrollo del análisis electroforético bidimensional hrCNE/hrCNE en el estudio de la movilidad electroforética de los complejos proteicos de la envuelta celular de *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*.
3. Detección e identificación de los componentes proteicos de los complejos de *Escherichia coli* y *Serratia marcescens* observados en una 1D hrCNE, mediante una 2D en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE.
4. Optimización de un protocolo combinado de diferentes agentes de “cross-linking” químico con la hrCNE.

5. Detección e identificación de los componentes minoritarios no detectados previamente mediante un análisis electroforético bidimensional 2D hrCNE/SDS-PAGE posterior a un tratamiento de “cross-linking” para *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*.
6. Evaluación final de los resultados obtenidos, y análisis comparativo de los mismos entre los diferentes tipos bacterianos utilizados.





MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESQUEMA EXPERIMENTAL.

El esquema experimental seguido en este trabajo se muestra en la **Figura 28**. Las técnicas citadas en el esquema serán introducidas en los apartados siguientes.

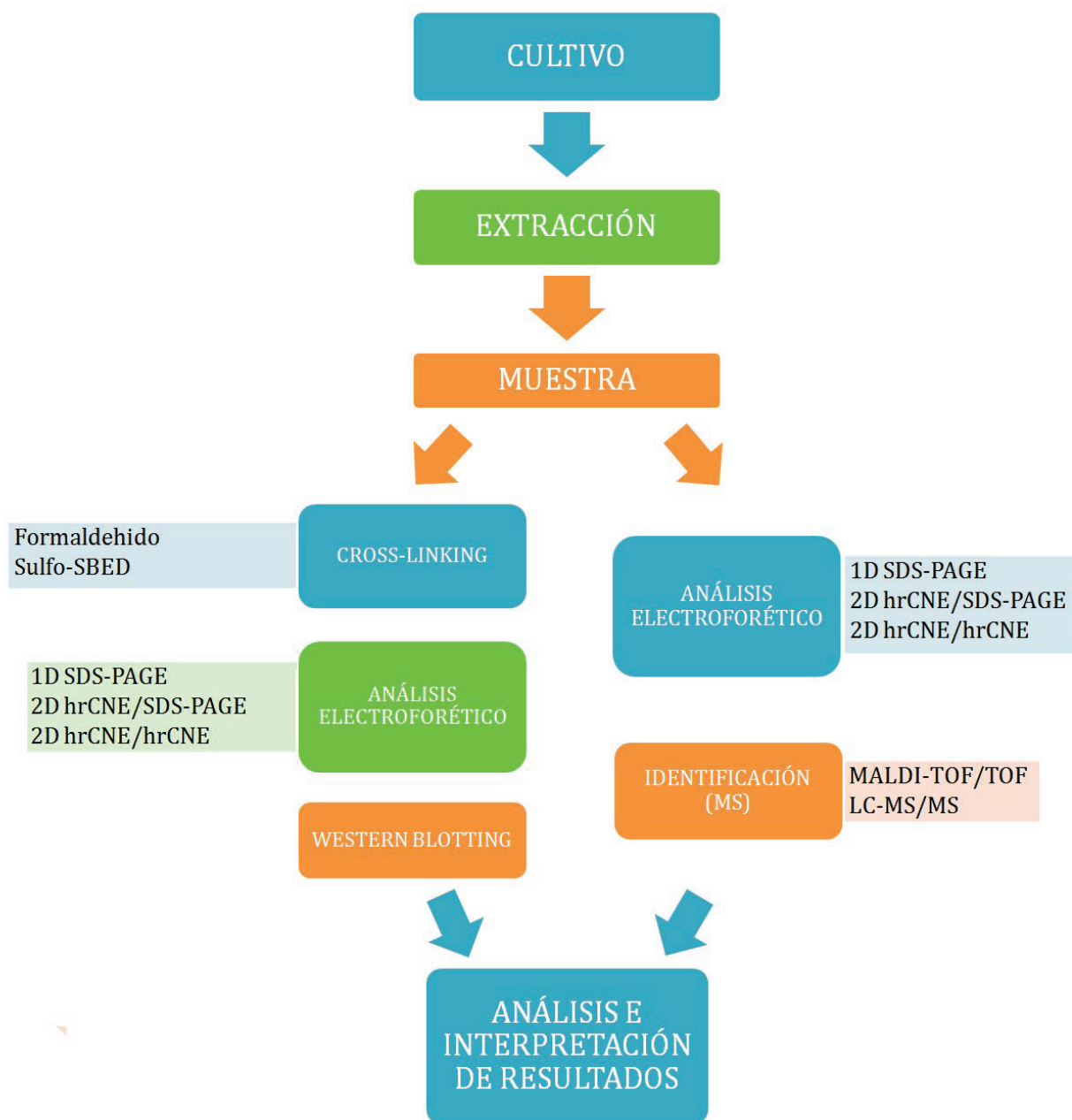


Figura 28. Representación esquemática simplificada del procedimiento experimental

2. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS

Las especies bacterianas utilizadas en este trabajo fueron tres: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Neisseria meningitidis*.

Para los estudios de *E. coli* se empleó la cepa 101¹⁴², y para los estudios de *S. marcescens* la cepa 846¹⁴³, ambas suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

La cepa de *N. meningitidis* elegida fue la cepa vacunal H44/76 utilizada por el Instituto Nacional Noruego de Salud Pública para desarrollar la vacuna de OMVs MenBvac. Esta cepa forma parte del serogrupo B, serotipo 15:P1.7 y subtipo 16.

3. CONSERVACIÓN

La conservación de las cepas bacterianas utilizadas se realizó a -80 °C en una solución estéril de leche descremada al 10% (p/v).

4. CULTIVO

El cultivo de *E. coli* se realizó mediante un aislamiento en estría en placas de medio sólido Luria-Bertani (LB), a partir de una alícuota almacenada a -80 °C, mientras que el cultivo de *S. marcescens* se realizó siguiendo el mismo método pero en placas de medio sólido *Peptone-Yeast* (PY). Tras 24 h de cultivo a 37 °C en atmósfera normal, se utilizó una colonia aislada para inocular un tubo con 2 mL de medio líquido LB en el caso de *E. coli*, y de medio líquido PY en el de *S. marcescens*. Dicho tubo de 2 mL fue incubado durante 8 h a 37 °C en agitación, y posteriormente estos 2 mL fueron utilizados para inocular a su vez un matraz de 100 mL del mismo medio líquido (PY para *S. marcescens* y LB para *E. coli*). El matraz de 100 mL de medio líquido fue cultivado, a su vez, durante 12 h a 37 °C en agitación. Pasado este tiempo, la suspensión bacteriana obtenida fue utilizada en el

¹⁴²<http://www.cect.org/vbac.php?cect=101&lan=es>.

¹⁴³<http://www.cect.org/vbac.php?cect=846&lan=es>.

proceso de extracción de OMVs. En los diferentes pasos del cultivo celular, se realizaron varios aislamientos de comprobación con el objetivo de descartar contaminaciones a lo largo del proceso.

El cultivo de *N. meningitidis* se realizó mediante un aislamiento en estría en placas de medio sólido CHOC-ISO, a partir de una alícuota almacenada a -80 °C. Tras 24 h de cultivo a 37 °C en atmósfera con un 5% de CO₂, se utilizó una colonia aislada para realizar un césped bacteriano en medio CHOC-ISO. El césped fue cultivado durante 8 h a 37 °C en atmósfera con un 5% de CO₂, y luego se recogió y resuspendió en un tubo de medio líquido Mueller-Hinton (MH), hasta alcanzar una densidad óptica de entre 1,6 y 1,8 a 540 nm. Esta suspensión se traspasó a un matraz de 100 mL de medio MH con 100 mM de Desferal (deferroxamina), y el matraz fue incubado a 37 °C durante 12-16 h en agitación. Del mismo modo que para *E. coli* y *S. marcescens*, en los diferentes pasos del cultivo de *N. meningitidis*, se realizaron diversos aislamientos de comprobación, con el objetivo de descartar contaminaciones a lo largo del proceso.

5. Extracción de OMVs mediante Prensa de French

Las OMVs fueron obtenidas siguiendo una variación del protocolo descrito por Gómez y colaboradores¹⁴⁴. Tras la incubación en el matraz de 100 mL, la suspensión bacteriana obtenida fue centrifugada a 10000 x *g* (8400 rpm) durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. En el caso de la suspensión bacteriana de *N. meningitidis*, se sometió previamente a una incubación de una hora a 56 °C, con el objetivo de matar las bacterias mediante choque térmico. Con esa excepción, el proceso de extracción fue idéntico en el caso de las tres especies empleadas en el estudio.

A continuación de esa primera centrifugación, se calculó el peso húmedo de la pellet, para resuspenderla posteriormente en agua MillQ, a razón de 4 mL por gramo de pellet. La suspensión fue homogenizada por agitación, con ultrasonidos

¹⁴⁴Gómez JA, Criado MT, Ferreirós CM. Cooperation between the components of meningococcal transferrin receptor, Tbp A and TbpB, in the uptake of transferrin iron by the 37-kDa ferric-binding protein (FbpA). *Res Microbiol.* 1998. 149: 382–387.

(3 pulsos de 5 segundos con un intervalo de parada entre pulso y pulso de 30 segundos) y posteriormente, se pasó un mínimo de tres veces por una Prensa de French a una presión de $1,1 \times 10^9$ kPa, con el objetivo de romper las células enteras e inducir la formación de OMVs. La suspensión resultante fue centrifugada a $10000 \times g$ (centrifugadora BECKMAN Optima™ TLX Ultracentrifuge, rotor TLA 100.3) durante 10 minutos a 4°C , y el sobrenadante fue a su vez ultracentrifugado a $200000 \times g$ (centrifugadora BECKMAN J2-21, rotor JA-18) durante 10 minutos a 4°C . El sobrenadante final se descartó, y la pellet conteniendo las OMVs fue resuspendida en agua MillQ.

En la **Figura 29** se describe esquemáticamente esta parte del proceso experimental.

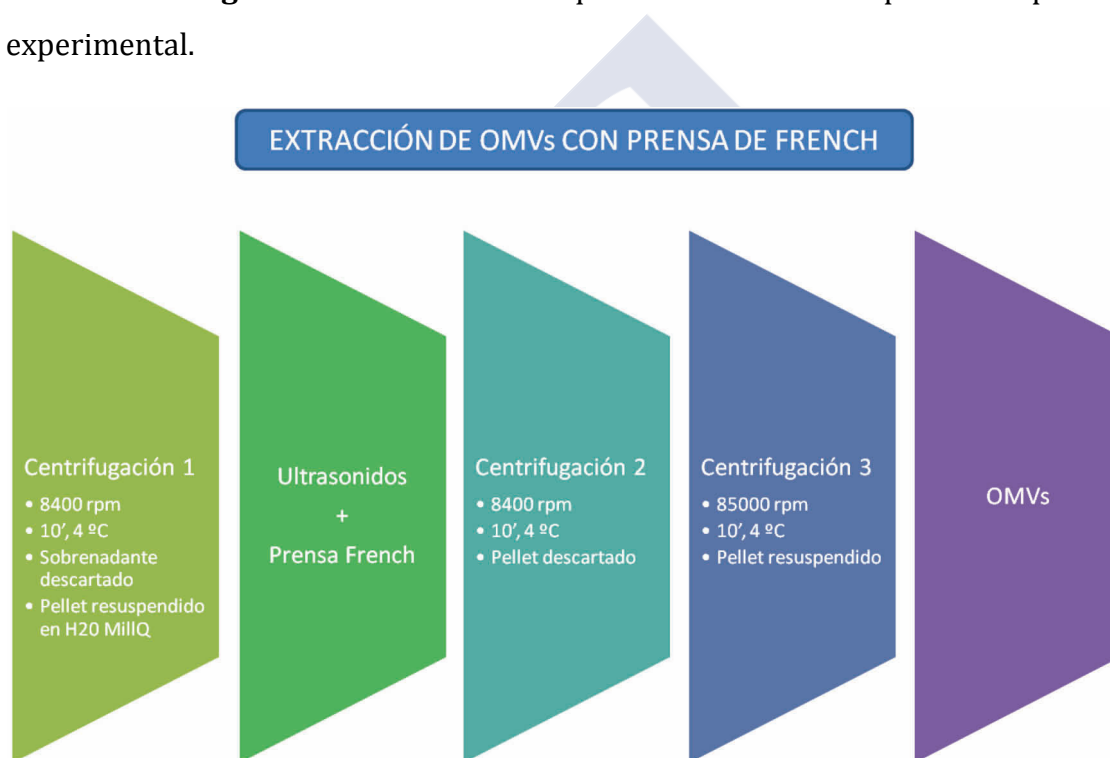


Figura 29. Representación esquemática del proceso de extracción de OMVs con Prensa de French.

6. VERIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO

La verificación de contenido proteico en la suspensión extraída se realizó mediante "Dot-blotting", añadiendo $2\mu\text{L}$ de la suspensión conteniendo los complejos proteicos sobre una de las cuadrículas de una membrana de nitrocelulosa. Asimismo, como control positivo se añadieron $2\mu\text{L}$ de BSA ("Bovine

Sero Albumine”), y como control negativo, 2 μ L de agua desionizada. La membrana se incubó durante 10 minutos a 37 °C hasta que estuvo completamente seca, y posteriormente fue teñida con el colorante Rojo Ponceau durante 30 segundos. A continuación se lavó y se dejó secar. La cuantificación del contenido proteico fue determinada espectrofotométricamente empleando el método del BCA¹⁴⁵ (ácido bicinconínico), siguiendo las instrucciones del fabricante (BCA Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, EEUU).

7. “CROSS-LINKING” QUÍMICO

“Cross-linking” químico con formaldehído. Para llevar a cabo la reacción de “cross-linking” químico de OMVs con formaldehído, a una suspensión de OMVs (4 μ g/ μ L) en tampón fosfato pH 6.8 se añadió formaldehído hasta una concentración final del 1%. La reacción de “cross-linking” fue realizada durante 30 minutos a temperatura ambiente, y pasado este tiempo, la solución conteniendo las OMVs con el formaldehído se ultracentrifugó a 200000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C. La pellet fue resuspendida en PBS, y se volvió a ultracentrifugar en las mismas condiciones de la primera ultracentrifugación. En este caso, la pellet conteniendo las OMVs se resuspendió en tampón fosfato, y el volumen total se distribuyó en alícuotas, almacenadas a continuación a -20 °C hasta el momento de su uso.

“Cross-linking” químico con el agente heterobifuncional Sulfo-SBED. La reacción de “cross-linking” químico de OMVs con el agente heterobifuncional Sulfo-SBED, suministrado por Pierce (Pierce, Rockford, IL, EEUU), requirió un primer paso de cálculo de la cantidad de agente de “cross-linking” necesaria. Esta cantidad fue calculada de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en función a la cantidad total de proteína sometida a la reacción de “cross-linking”, al peso molecular de las proteínas específicas de la muestra, y al exceso molar. En el caso concreto de este estudio, la cantidad de proteína fue variable en cada caso, y debido a la variabilidad

¹⁴⁵Smith PK, Krohm RI, Hermason GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using Bicinchononic acid. *Anal. Biochem.* 1985. 150: 76–85.

de pesos moleculares de las proteínas involucradas, fueron ensayados diferentes pesos moleculares específicos (30 kDa, 50 kDa, 70 kDa, 90 kDa, para *E. coli* y *S. marcescens*; 30 kDa, 38 kDa, 50 kDa, 60 kDa, para *N. meningitidis*). El exceso molar, variable entre 1 y 5, se estableció en 3.

En un paso previo a la reacción de “cross-linking”, se resuspendió el vial individual de Sulfo-SBED liofilizado en 25 μ L de DMSO, de modo que la concentración final del agente fue de 40 μ g/ μ L. En función de los cálculos previos, se añadió a la solución de OMVs un determinado volumen de la solución stock de Sulfo-SBED, y posteriormente la mezcla se mantuvo 2 h a 4^o C. Hasta realizar la fotoactivación, todos los pasos del protocolo se llevaron a cabo en oscuridad para evitar el inicio involuntario de la fotoactivación.

Transcurrido ese tiempo, la solución se sometió a un proceso de diálisis en unidades de mini-diálisis durante toda la noche, con el objetivo de eliminar el exceso de Sulfo-SBED. El tampón de diálisis, “Buffer Transfer 1x” también fue suministrado por Pierce (Pierce, Rockford, IL, EEUU). En el paso de fotoactivación realizado tras la diálisis, la solución de OMVs con Sulfo-SBED en hielo fue sometida a la acción de luz UV durante 20 minutos, con el foco de emisión a 5 cm de la solución. Tras este tiempo, el volumen total fue almacenado a -80 $^{\circ}$ C en alícuotas hasta el momento de su preparación para el análisis electroforético.

8. ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO 1D SDS-PAGE

La caracterización del perfil proteico se llevó a cabo, tanto en las OMVs nativas como en las OMVs sometidas a la reacción de “cross-linking”, mediante una electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE.

Se utilizaron para ello geles de poliacrilamida de un 12%, y 1,5 mm de grosor como soporte electroforético, en presencia del detergente aniónico SDS, y siguiendo el protocolo de tampón discontinuo desarrollado por Laemmli¹⁴⁶. Como geles separadores se utilizaron geles de poliacrilamida de un 4%.

¹⁴⁶Laemmli UK. Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T⁴. *Nature*. 1970. 227: 680.

En la preparación de la muestra, se tomó un volumen determinado de suspensión de OMVs de una determinada concentración proteica, y se añadió un volumen igual de tampón de muestra 2x. Posteriormente, se cargaron 10 µg de proteína por carril sencillo, o 20 µg de proteína en el caso de carriles dobles.

La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Mini-PROTEAN 3 Cell (BioRad Lab., Richmond, CA, EEUU), a temperatura ambiente y un voltaje constante de 200 V, en aproximadamente 60 minutos. Como marcadores de peso molecular se utilizaron 8 µL de Standards Low-Range, ambos suministrados por BioRad Lab. (Richmond, CA, EEUU).

Tras la electroforesis, las proteínas fueron fijadas por medio de ácido tricloroacético (TCA) al 12%, durante una hora, a temperatura ambiente y con agitación, y posteriormente se tiñeron con el colorante CBB¹⁴⁷ durante 4 h. Finalmente, se destiñeron mediante sucesivos lavados de agua destilada.

9. ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPLEJOS PROTEICOS 1D hrCNE

Con el objetivo de separar y analizar los diferentes complejos de las OMVs se utilizó el sistema electroforético no desnaturizante hrCNE, siguiendo una variación del protocolo descrito por Wittig y colaboradores⁷⁰.

Preparación de los geles. Como soporte electroforético se emplearon minigeles de poliacrilamida de 1,5 mm de grosor para el sistema Mini-PROTEAN 3 Cell (BioRad Lab., Richmond, CA, EEUU): un gel concentrador del 4% de poliacrilamida, y un gel separador en gradiente del 5% al 15% o del 8% al 11% de poliacrilamida, dependiendo del caso. Los geles incluyeron además Bis-Tris 50 mM, ácido 6-aminohexanoico 500 mM, glicerol 15,3% (v/v) (sólo incluido en la solución de mayor porcentaje de poliacrilamida), persulfato amónico 0,46% y TEMED 0,046% (v/v). Los gradientes se prepararon con el sistema BioRad Gradient Former siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez polimerizados se guardaron a 4 °C sumergidos en una solución Bis-Tris 50 mM, ácido 6-

¹⁴⁷Neuhoff V, Stam R, Eibl H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrilamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis*. 1985. 6: 427-448.

aminohexanoico 500 mM hasta su uso, durante un máximo de tres días. El gel concentrador se aplicó el mismo día de la electroforesis.

Tampones de electroforesis. En todas las electroforesis nativas se utilizó el mismo tampón de ánodo (Bis-Tris-HCl 50 mM, pH 7.0). Para el cátodo, sin embargo, se emplearon dos tampones que se diferenciaban en el detergente neutro utilizado, DDM, OG y TX-100:

- Tampón de cátodo DDM: Tricina 50 mM, Bis-Tris-HCl 15 mM, DOC 0,05%, DDM 0,39 mM pH 7.0.
- Tampón de cátodo OG: Tricina 50 mM, Bis-Tris-HCl 15 mM, DOC 0,05%, OG 2 mM pH 7.0.
- Tampón de cátodo TX-100: Tricina 50 mM, Bis-Tris HCl 15 mM, DOC 0,05%, TX-100 0,8 mM, pH 7.0.

Preparación de la muestra. Por cada carril se cargó una muestra de OMVs en diferentes cantidades de proteína total, pero llevadas siempre a una dilución de trabajo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$. Posteriormente se les añadió tampón de muestra para hrCNE (Bis-Tris-HCl 50 mM, ácido 6-aminohexanoico 1 M) y solución detergente (DDM 10% p/v) hasta alcanzar la concentración final de ácido 6-aminohexanoico 87 mM, Bis-Tris-HCl 4,3 mM y DDM 8 mM (ratio DDM/proteína=5). Tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se ultracentrifugó durante 15 minutos a 100000 x g y a una temperatura de 4 °C. Antes de cargar la muestra tratada en el gel, a cada sobrenadante se le añadió 5% de glicerol (v/v) y 0,01% de rojo Ponceau (p/v).

Condiciones electroforéticas. Las electroforesis transcurrieron a 4 °C y a un voltaje de 50 V la primera hora y de 100 V hasta su finalización, empleando para ello aproximadamente 6 h. Como marcadores de peso molecular se utilizó el kit “High Molecular Weight Calibration” para electroforesis nativa (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Para determinar el término de la electroforesis se cargó un pocillo con marcadores de peso molecular coloreados (BioRad Kaleidoscope Standards). Una vez que el frente de rojo

Ponceau alcanzó el final del gel, se continuó con la electroforesis hasta que el frente formado por los marcadores Kaleidoscope también lo hizo.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron fijadas por medio de TCA al 12%, durante 1 h, a temperatura ambiente y con agitación, y posteriormente se tiñeron con CBB durante 4 h. Finalmente, se destiñeron mediante sucesivos lavados de agua destilada.

10. ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPLEJOS PROTEICOS Y SU COMPOSICIÓN 2D hrCNE/SDS-PAGE

Para la realización de una 2D en condiciones desnaturalizantes, se cortó un carril de la 1D hrCNE, utilizando como referencias el pocillo y el rojo Ponceau que marca el frente. Posteriormente, se sumergió la tira en tampón de muestra SDS (Tris-HCl 62,5 mM, SDS al 2% (v/v), glicerol al 10% (v/v), azul de bromofenol al 0,005%) durante 10 minutos a 95 °C. Tras la incubación en el tampón de muestra, la tira fue sometida a un equilibrado de 5 minutos en el tampón utilizado en la 2D, y fue colocada horizontalmente sobre un minigel para SDS-PAGE con un 12% de poliacrilamida en el gel separador y un 4% en el concentrador, moldeado este último con un peine ciego para la acomodación de la tira. Esta se colocó de tal forma que todo el largo de la tira estuviese en contacto con el concentrador, evitando atrapar burbujas de aire entre ambos. La SDS-PAGE se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos estandar¹⁴⁶.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron fijadas con TCA al 12%, durante 1 h, a temperatura ambiente y con agitación, y posteriormente se tiñeron con CBB durante 4 h. Finalmente, se destiñeron mediante sucesivos lavados de agua destilada.

11. ANÁLISIS DEL PERFIL DE COMPLEJOS PROTEICOS Y SU MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA 2D hrCNE/hrCNE

Para la realización de la electroforesis 2D hrCNE/hrCNE se colocó una tira de gel de la 1D, cortada como se explica en el punto anterior, sobre otro gel de las mismas características (separador: 5-15% o 8-11% de poliacrilamida, concentrador: 4% de poliacrilamida, 1,5 mm de grosor). En la 1D se utilizó el DDM como detergente del tampón de cátodo, mientras que en la 2D se utilizó el OG o TX-100, dependiendo del caso. Entre la 1D y la 2D se realizó un equilibrado de 5 minutos de la tira de gel en el tampón de cátodo utilizado en la 2D.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron fijadas con TCA al 12%, durante 1 h, a temperatura ambiente y con agitación, y posteriormente se tiñeron con CBB durante 4 h. Finalmente, se destiñeron mediante sucesivos lavados de agua destilada.

12. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE LAS IMÁGENES DE GELES

Los geles se escanearon utilizando el BioRad GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad Lab., Richmond, CA, EEUU), a una resolución de 1200 dpi. Para el análisis de las imágenes se utilizaron los programas PDQuest versión 7.4.0 y Quantity One de BioRad. El peso molecular de las proteínas y complejos proteicos se aproximaron utilizando los estándares para SDS-PAGE de BioRad y los estándares de alto peso molecular de Amersham Biosciences para electroforesis nativa.

13. “WESTERN-BLOTTING” DE PROTEOLIPOSOMAS

Tras la separación de componentes proteicos de *N. meningitidis*, estos fueron transferidos a una membrana de PVDF siguiendo las instrucciones del fabricante tal y como se explica a continuación.

Se cortaron dos piezas de papel Whatman y la membrana de PVDF del mismo tamaño que el gel a transferir. El papel Whatman y las almohadillas de fibra

se equilibraron en tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v), pH 9.2) durante al menos 15 minutos. La membrana de PVDF se equilibró con un baño de 15 seg de metanol, un lavado de 2 minutos de agua desionizada, y un baño de 15 minutos en tampón de transferencia. Los diferentes componentes se montaron en forma de sándwich en el siguiente orden: una almohadilla de fibra, un papel Whatman, el gel a transferir, la membrana de polivinilideno (PVDF), un papel Whatman y otra almohadilla de fibra, de tal modo que la membrana de PVDF se encontraba situada entre el gel y el ánodo.

La transferencia de proteínas a la membrana de PVDF se realizó aplicando una corriente constante de 350 mA durante una hora a 4º C. Terminada la transferencia, la membrana se bloqueó en TBS con Blotto (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA) al 5%, y agitación continua durante una hora a temperatura ambiente, y se lavó otras tres veces con TBS-Tween. Tras el lavado se incubó con suero anti-OMV de *N. meningitidis* H44/76 a dilución 1:1000 en TBS-Tween con Blotto 1%, durante 90 minutos a 37º C en agitación. Tras tres lavados con TBS-Tween, la membrana se incubó durante 90 minutos a 37º C en agitación, con anticuerpos de conejo anti-Ig de ratón conjugados a peroxidasa diluidos 1:1000 en TBS-Tween con Blotto al 1%. La membrana se sometió de nuevo a tres lavados de TBS-Tween, y se reveló con PBS/H₂O₂/4-cloro-1 α -naftol durante 20 minutos deteniendo la reacción con agua desionizada.

14. “WESTERN-BLOTTING” DE OMVS

Tras la separación de componentes proteicos, estos fueron transferidos a una membrana de PVDF siguiendo las instrucciones del fabricante tal y como se explica a continuación.

Se cortaron dos piezas de papel Whatman y la membrana de PVDF del mismo tamaño que el gel a transferir. El papel Whatman y las almohadillas de fibra se equilibraron en tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% (v/v), pH 9.2) durante al menos 15 minutos. La membrana de PVDF se equilibró con un baño de 15 segundos de metanol, un lavado de 2 minutos de agua desionizada, y un baño de 15 minutos en tampón de transferencia. Los diferentes

componentes se montaron en forma de sándwich en el siguiente orden: una almohadilla de fibra, un papel Whatman, el gel a transferir, la membrana de polivinilideno (PVDF), un papel Whatman y otra almohadilla de fibra, de tal modo que la membrana de PVDF se encontraba situada entre el gel y el ánodo.

La transferencia de proteínas a la membrana de PVDF se realizó aplicando una corriente constante de 350 mA durante una hora a 4º C. Terminada la transferencia, la membrana se bloqueó en TBS con Blotto (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA) al 5%, y agitación continua durante una hora a temperatura ambiente, y se lavó otras tres veces con TBS-Tween. Tras el lavado se incubó con estreptavidina a dilución 1:1000 en TBS-Tween con Blotto 1%, durante 90 minutos a 37º C en agitación. Posteriormente, se sometió a tres lavados de TBS-Tween, y se reveló con PBS/H₂O₂/4-cloro-1 α -naftol durante 20 minutos deteniendo la reacción con agua desionizada.

15. IDENTIFICACIÓN DE COMPLEJOS PROTEICOS Y COMPONENTES MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Análisis por nanoLC-MS/MS. La identificación de componentes y complejos proteicos separados por la 1D hrCNE y la 2D hrCNE/hrCNE se llevó a cabo mediante un análisis espectrométrico nanoLC-MS/MS, realizado por el CIC bioGUNE (Parque Tecnológico de Bizkaia, Derio, España).

Las muestras deshidratadas fueron resuspendidas en ácido fórmico 0.1% y analizadas mediante el sistema de cromatografía en fase reversa UPLC (Waters, Milford, USA). Los péptidos se desalinizaron en un cartucho Symmetry C18 (Waters, Milford, USA) y fueron separados con una columna analítica (Atlantis C18, 75 μ m id x 15 cm, Waters) mediante una ionización por electrospray integrada (SilicaTips for Micromass Spray NanoFlow, 10 μ m de diámetro, New Objective). Los péptidos se introdujeron con un ratio de flujo de 250 nL/min desde la columna analítica directamente para el ionizador por electrospray (SilicaTips for Micromass Spray NanoFlow, 10 μ m de diámetro, New Objective), utilizando un gradiente de 4 horas del 3% al 50% de solvente B. Los datos fueron obtenidos en modo DDA, con un espectro completo (m/z: 300-1500) seguido de MS/MS (m/z: 50-1995) para los

ocho iones más abundantes, cada 4 segundos. El argón fue utilizado como gas de colisión, y las energías de colisión variaron en función del valor m/z y la carga de cada péptido. La exclusión dinámica fue incorporada cada 30 segundos, y se analizó un compuesto de referencia (glufibrinopéptido B) como referencia cada diez scans.

El motor de búsqueda utilizado fue el Mascot v 2.2.03, y los parámetros de búsqueda en la base de datos fueron los siguientes: enzima, *tripsina*; modificaciones fijadas, *carboxiamidometil cisteína*; modificaciones variables, *oxidación de metionina*, *acetilación* y *deamidación*; número de sitios de rotura perdidos, 1.

Análisis por MALDI-TOF/TOF. La identificación de las proteínas separadas por electroforesis 2D hrCNE/SDS-PAGE se llevó a cabo mediante MALDI-TOF/TOF, por el CIC bioGUNE (Parque Tecnológico de Bizkaia, Derio, España), y el servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Santiago de Compostela (USC).

El procedimiento seguido por ambos servicios es detallado a continuación:

➤ CIC bioGUNE

Los puntos del gel fueron digeridos con tripsina en un digestor automático Proteineer DP (Bruker) siguiendo un protocolo estándar de Bruker para la digestión en gel, que incluyó una fase de reducción con DTT (10 mM) seguida de una alquilación con IA (55 mM). Tras la alquilación, los puntos del gel fueron deshidratados con ACN y rehidratados con tripsina (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Este proceso de digestión duró 4 horas. Posteriormente, los péptidos fueron extraídos con dos fases de ACN/TFA 0,1% peso seco/húmedo, y finalmente la extracción se deshidrató con SpeedVac (Christ) y almacenada a -20°C hasta el momento del MALDI-TOF/TOF. Cada muestra se preparó en un AnchorChip 800 Target (Bruker), utilizando una matriz de 4-HCCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid). Se llevó a cabo un análisis MS y MS/MS con un espectrómetro Autoflex Smartbeam TOF/TOF (Bruker), equipado con un selector de iones LIFT y un reflector de iones Reflectron.

Los datos se obtuvieron de forma automática (modo fuzzy-logic), y la identificación se realizó con el software BioTools 3.2, usando el motor de búsqueda Mascot v 2.2.03 y la base de datos Swiss Prot (V 57.9).

Las muestras fallidas en modo automático se seleccionaron y desalinizaron con microcolumnas caseras usando tips GELoader (Eppendorf) con 1 mm de cama cromatográfica. Los péptidos fueron eluidos con la matriz 4-HCCA sobre una diana MALDI (Anchor-chip 600-384, Bruker), y desecadas a temperatura ambiente. Los puntos resultantes se analizaron con el mismo equipo pero en modo manual, tomando 1400 scans para PMF y 2000 para MS/MS. Las identificaciones utilizaron el mismo software, motor de búsqueda y base de datos que en modo automático.

➤ Servicio de Espectrometría de masas de la USC

Digestión trípica. Los spots del gel de 2D se digirieron según el protocolo de digestión trípica en gel con Reducción-Alquilación de Millipore, que está adaptado de los protocolos publicados en Parker, et al. Electrophoresis 19:1920-1932. Este proceso de digestión lleva los siguientes fases: reducción-alquilación que se realizó con DTT 10mM e IA 55mM; desteñido con ABC 25mM/5% ACN y ABC 25mM/ 50% ACN; deshidratación con ACN; digestión con tripsina (13,7 µg/ml) durante 3horas y extracción con TFA 0,2%. Los péptidos extraídos fueron deshidratados en SpeedVac (ThermoSavant) y almacenados a -80 °C hasta su análisis.

Análisis MS. Los péptidos de cada muestra se resuspendieron en TFA 0,1% y fueron preparados en una placa Prespotted AnchorChip 96 Set for Proteomics (Bruker). Se realizaron análisis MS, en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF, (Ultraflex III TOF/TOF de Bruker), realizando la adquisición en modo automático y verificando posteriormente de modo visual la calidad de los espectros obtenidos. La identificación se realizó con el software BioTools v 3.2, usando el motor de búsqueda Mascot 2.2 y los siguientes parámetros de búsqueda: base de datos: *SwissProt V 56.8*; taxonomía: *Escherichia coli*; tipo de búsqueda: *Peptide Mass Fingerprint*; enzima: Trypsin; modificaciones fijas: Carbamidomethyl (C); modificaciones variables: Oxidation (M).

Para la muestra 66 se realizó la identificación con dos bases de datos: SwissProt V 56.8 y NCBIInr v 20100228. Para la muestra 13, se realizó un análisis MSMS en modo LIFT, con los mismos parámetros de búsqueda anteriores, al resultar fallida la identificación inicial.





RESULTADOS

1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE *E. COLI*

1.1. Análisis electroforético e identificación de proteínas por nanoLC-MS/MS

Con el objetivo de analizar el complexoma de envuelta celular de *Escherichia coli*, las OMVs extraídas utilizando la prensa de French fueron sometidas a un análisis electroforético mediante electroforesis nativa hrCNE.

En un primer análisis electroforético, se llevó a cabo una 1D hrCNE utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, y deoxicolato como detergente aniónico, algo común a todos los análisis electroforéticos nativos incluidos en el apartado de Resultados. La finalidad de dicho análisis fue la separación de los diferentes complejos proteicos ubicados en las de OMVs en unas condiciones lo suficientemente suaves como para mantener la interacción entre sus componentes.

La **Figura 30** muestra el perfil proteico obtenido de la 1D hrCNE. Del conjunto de bandas identificadas visualmente, se llevó a cabo la selección de 26 de ellas, en función de la intensidad relativa de dichas bandas con respecto a las demás, que fueron descartadas por la débil señal mostrada. Dichas bandas se denominaron con la letra D seguida de la numeración correspondiente, de mayor a menor movilidad electroforética. En la **Figura 30** únicamente se señalan las bandas identificadas correctamente.

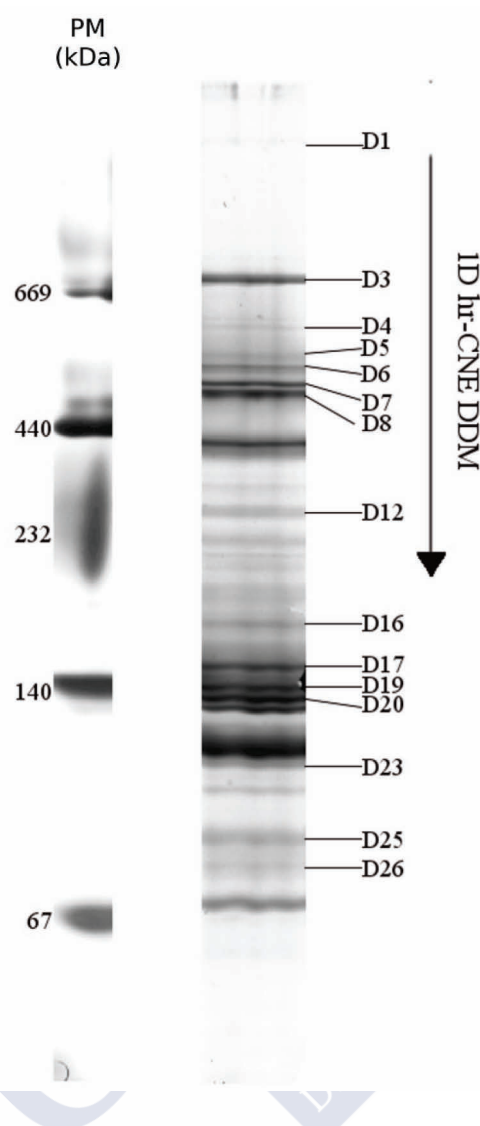


Figura 30. Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de *E. coli* obtenido utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo. PM: Pesos Moleculares.

Las 26 bandas elegidas fueron escindidas del gel de la 1D hrCNE, para proceder a su posterior análisis por espectrometría de masas mediante nanoLC-MS/MS. De estas 26, 15 de ellas resultaron en una identificación positiva. El resultado de dichas identificaciones se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Identificación por nanoLC-MS/MS de los principales componentes de las OMVs de *E. coli* detectadas mediante 1D hrCNE.

Banda	MW kDA	Código Uniprot KB	ID	Peptidos	Score	Cobertura secuencia (%)
D1	1087,85	P0ADF6	6-phosphogluconate dehydratase	1	28	1
D3	706,38	P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	4	181	9
		Q8XDR3	ATP-dependent helicase	1	22	1
D4	609,74	P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	1	58	2
D5	553,95	P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	2	85	7
		P0AC41	Succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	1	70	2
D6	538,23	P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	1	117	7
		Q8XDR3	ATP-dependent helicase	1	31	2
		Q8X9A8	Succinate dehydrogenase (iron-sulfur subunit)	1	28	2
D7	509,74	Q8X8B7	Formate dehydrogenase (major subunit)	2	104	3
		P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	2	79	4
		Q8X8B8	Formate dehydrogenase (iron-sulfur subunit)	2	52	9
D8	495,28	P0A9A0	Ferritin	4	233	14
D12	306,41	B1LDI8	IS66 family transposase orfB	1	24	2
D16	185,98	P0ABA0	ATPase (b subunit)	2	82	15
		P0ABJ9	Cytochrome bd ubiquinol oxidase (subunit I)	2	64	4
		Q8XDR3	ATP-dependent helicase	1	31	1

Banda	MW kDA	Código Uniprot KB	ID	Peptidos	Score	Cobertura secuencia (%)
D17	154,14	P02943	LamB (maltoporin)	2	60	7
D19	140,64	P02931	OmpF (porin F)	3	81	8
D20	135,53	P02931	OmpF (porin F)	9	173	15
		P0A9P2	Dihydrolipoamide dehydrogenase	1	44	2
		P02932	Outer pore protein E (precursor)	2	30	5
		065942	Z4999 hypothetical protein	4	23	9
D23	113,0	P0ABP8	Purine nucleoside phosphorylase deoD-type	1	90	5
		P0ABP8	Purine nucleoside phosphorylase deoD-type	1	90	9
		P0ADZ7	YajC (preprotein translocase subunit)	1	23	12
D25	87,15	P69435	Outer membrane protein PgaA	1	27	1
D26	80,1	P0A911	OmpA (porin A)	3	84	9
		P08839	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	3	27	1

Con el objetivo de resolver posibles co-migraciones de los complejos proteicos en la 1D, se realizó un análisis electroforético bidimensional en condiciones nativas 2D-hrCNE/hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo de la 1D, y otro detergente no iónico diferente en la 2D. Se realizaron ensayos previos con diferentes detergentes no iónicos para esta 2D (Triton X-100, digitonina y octil- β -glucopiranosido), pero la mejor resolución y definición de complejos fue obtenida con el OG. El análisis electroforético bidimensional nativo 2D hrCNE/hrCNE permite observar las diferencias de movilidad electroforética de los complejos separados en relación al detergente no

iónico utilizado en el tampón de cátodo, así como determinar qué complejos proteicos forman las principales bandas de la 1D.

La **Figura 31** muestra el mapa bidimensional obtenido.

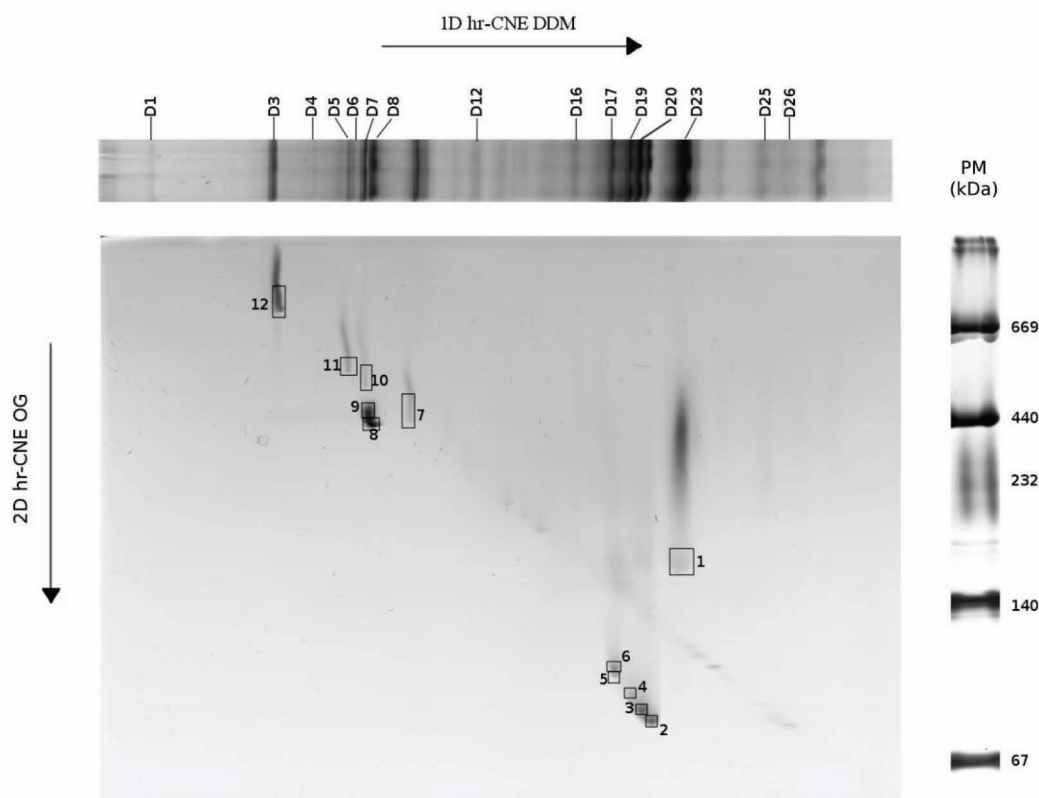


Figura 31. Mapa bidimensional de OMVs de *E. coli* obtenido mediante análisis electroforético 2D hrCNE/hrCNE, utilizando DDM en la 1D, y OG en la 2D. La 1D se corresponde con la mostrada en la **Figura 30**.

En el mapa proteico mostrado en la **Figura 31** se pueden observar diferentes tipos de puntos según su posición: aquellos cuya movilidad electroforética no depende del tipo de detergente no iónico utilizado en el tampón de cátodo (DDM u OG, en este caso), y que son reconocibles por dibujar una diagonal de izquierda a derecha, arriba-abajo, es decir, de mayor a menor movilidad electroforética; y aquellos cuya movilidad electroforética si varía en función del detergente no iónico utilizado, situándose estos o bien por encima o por debajo de dicha diagonal.

De entre los puntos presentes en la **Figura 31**, se escindieron los 12 situados por encima o por debajo de la diagonal, esto es, los que mostraban una movilidad electroforética diferente en relación al detergente no iónico utilizado en el tampón de cátodo, para proceder a continuación a su análisis por espectrometría de masas mediante nanoLC-MS/MS. Dichos puntos fueron denominados anteponiendo las letras OG a la numeración. Como se puede observar, los puntos se encuentran situados en la vertical de las bandas de la 1D que muestran una mayor intensidad relativa. De los 12 puntos seleccionados, todos resultaron en una identificación positiva, y el resultado de dichas identificaciones se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Identificación por nanoLC-MS/MS de los principales componentes de las OMVs de *E. coli* detectadas mediante 2D hrCNE/hrCNE.

Punto	MW kDa	Código Uniprot KB	ID	Péptidos	Score	Cobertura secuencia (%)
OG1	175,9	P0ABJ9	Cytochrome bd ubiquinol oxidase (subunit I)	9	179	10
		P0ABK4	Cytochrome bd ubiquinol oxidase (subunit II)	4	123	6
		P0ABJ9	Cytochrome bd ubiquinol oxidase (subunit I)	8	98	8
OG2	81,0	P02931	OmpF (porin F)	22	510	33
OG3	84,7	P02931	OmpF (porin F)	25	840	46
		P02931	OmpF (porin F)	25	840	46
		P02931	OmpF (porin F)	25	814	43
		P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	2	139	8

Punto	MW kDa	Código Uniprot KB	ID	Péptidos	Score	Cobertura secuencia (%)
OG4	90,3	P02931	OmpF (porin F)	23	842	7
		B1LJ73	EcSMS35 hypothetical protein	1	35	1
OG5	99,3	P02943	LamB (malto porin)	17	756	39
		P02943	LamB (malto porin)	15	701	30
		P02931	OmpF (porin F)	6	230	19
OG6	103	P02943	LamB (malto porin)	20	903	40
		P02943	LamB (malto porin)	18	830	31
		P02931	OmpF (porin F)	3	122	7
		P00816	Cyanate dehidratase	1	35	2
OG7	491,2	P0ABD3	Bacterioferritin	11	431	46
		P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	1	56	3
OG8	443,2	P0A9A0	Ferritin	27	412	57
		P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	9	288	21
		B1LJ73	EcSMS35 hypothetical protein	1	32	1
OG9	443,2	P0A9A0	Ferritin	6	267	38
		P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	3	129	9
		P00816	Cyanate hidratase	1	36	1
OG10	534,3	Q7A9A6	Formate dehidrogenase (major subunit)	22	691	24
		Q8X8B8	Formate dehidrogenase	5	173	14

Punto	MW kDa	Código Uniprot KB	ID	Péptidos	Score	Cobertura secuencia (%)
		(iron-sulfur subunit)				
		P0AEL2	Formate dehydrogenase (gamma subunit)	1	69	6
		P0A9A0	Ferritin	2	45	14
		P0AC41	Succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	1	37	2
OG11	580,7	P0A9C5	Glutamine synthetase	19	572	53
		P0A9M8	Phosphate acetyltransferase	6	184	8
		P0ABB6	ATPase (beta subunit)	3	94	8
		P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	2	83	8
		P0ABB0	ATPase (alfa subunit)	2	81	5
		B7UIL8	1-deoxy-D-xylulose phosphate reductoisomerase	1	40	2
		B1LJ73	EcSMS35 hypothetical protein	1	30	1
OG12	781,5	P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	45	2263	64
		P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	8	243	14
		P33232	L-lactate dehydrogenase	8	243	4
		Q8X9A8	Succinate dehydrogenase (iron- sulfur subunit)	2	58	10

1.2. Análisis electroforético e identificación de proteínas en 2D hrCNE/SDS-PAGE por MALDI-TOF/TOF

Con el objetivo principal de caracterizar los componentes de los complejos proteicos contenidos en las OMVs de *E. coli*, estas fueron sometidas a un análisis electroforético bidimensional hrCNE/SDS-PAGE, durante el cual los complejos proteicos fueron separados en una 1D por la técnica electroforética nativa hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, y posteriormente sometidos a una 2D en condiciones desnaturalizantes, utilizando la técnica electroforética desnaturalizante SDS-PAGE.

La **Figura 32** muestra el mapa proteico obtenido.

En base al mapa proteico obtenido mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE, se seleccionaron 71 puntos relevantes por su intensidad relativa y/o localización con respecto a las bandas de la 1D, que fueron posteriormente analizados por espectrometría de masas mediante “peptide mass fingerprinting” MALDI-TOF/TOF. Dichos puntos fueron escindidos del gel y analizados. En este caso, los puntos seleccionados para su identificación fueron denominados con la letra M antecediendo a la numeración. De los 71 puntos analizados, 64 de ellos dieron lugar a una identificación fiable. Los resultados de dichas identificaciones se muestran en la **Tabla 6**.

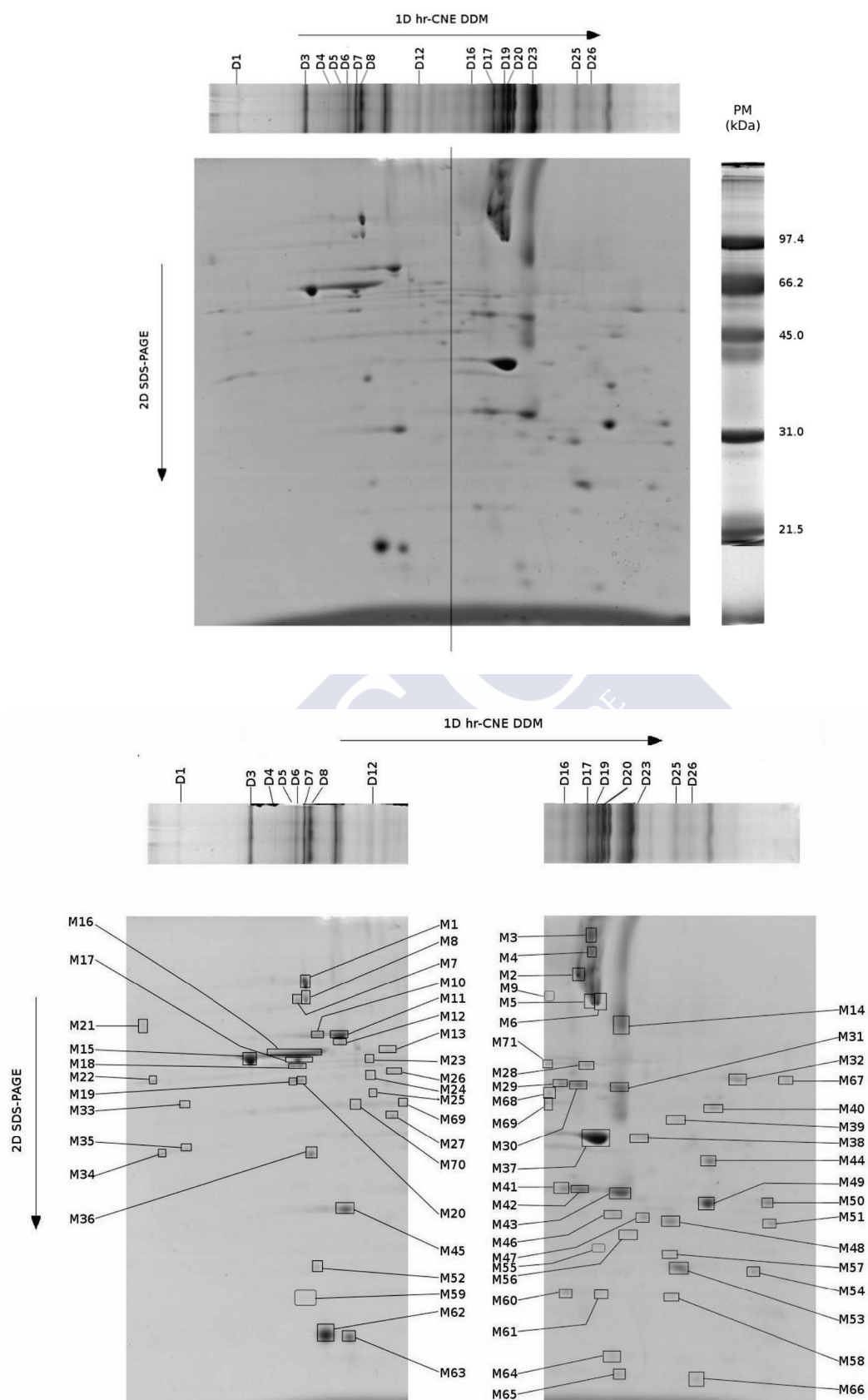


Figura 32. Mapa bidimensional de OMVs de *E. coli* obtenido mediante análisis electroforético 2D hrCNE/SDS-PAGE, utilizando DDM como detergente no iónico en la 1D. La 1D se corresponde con la mostrada en la **Figura 30**.

Tabla 6. Identificación por MALDI-TOF/TOF de los principales componentes de OMVs de *E. coli* detectados mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE.

Punto	MW kDa	Código UniprotKB	ID	Score	Cobertura secuencia(%)	RMS error
M2	50,06	A7ZUQ8	LamB (malto porin)	91	16	9
M3	50,94	P0A9P2	Dihydrolipoamide dehydrogenase	107	21	13
M4	50,94	P0A9P2	Dihydrolipoamide dehydrogenase	120	18	20
M5	39,30	P02931	OmpF (porin F)	154	19	11
M6	39,30	P02931	OmpF (porin F)	104	8	7
M7	82,87	P76558	NADP-dependent malic enzyme	98	13	21
M8	113,27	P32176	Formate dehydrogenase (major subunit)	210	19	22
M10	65,08	P0AC43	Succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	161	31	4
M11	65,08	P0AC43	Succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	234	32	5
M12	65,08	P0AC43	Succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	202	27	4
M13	60,97	P23843	Periplasmic oligopeptide- binding protein	138	19	16
M14	58,33	P0ABK0	Cytochrome bd ubiquinol oxidase (subunit I)	126	13	11
M15	57,46	P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	240	39	9
M16	57,46	P0A6F5	Chaperonine GroEL (chain A)	243	32	9
M17	52,09	P0A905	Glutamine synthetase	159	23	16
M18	55,41	A7ZTU6	ATPase (alpha subunit)	175	24	22

Punto	MW kDa	Código UniprotKB	ID	Score	Cobertura secuencia(%)	RMS error
M19	50,35	A7ZTU4	ATPase (beta subunit)	258	45	11
M20	50,35	A7ZTU4	ATPase (beta subunit)	190	31	14
M21	66,11	P06959	Acetyltransferase component (residue) of pyruvate dehydrogenase	236	22	14
M22	50,94	P0A9P2	Dihydrolipoamide dehydrogenase	199	31	14
M23	36,35	Q8FE70	ygfZ tRNA-modifying protein	103	19	43
M24	55,41	A7ZTU4	ATPase (beta subunit)	211	36	14
M25	48,38	P0ABH8	Citrate synthase	126	19	5
M26	53,70	P02930	TolC outer membrane protein	94	18	10
M27	41,40	P39377	Isoaspartyl dipeptidase	114	23	6
M28	50,94	P0A9P2	Dihydrolipoamide dehydrogenase	147	27	5
M29	160,15	P16917	Protein rhsB	103	9	55
M30	58,33	P0ABK0	Cytochrome bd ubiquinol (subunit I)	145	15	7
M31	58,33	P0ABK0	Cytochrome bd ubiquinol (subunit I)	152	15	4
M32	50,35	A7ZTU4	ATPase (beta subunit)	212	39	13
M33	45,51	P0ABC8	Protein hflK	113	13	15
M34	39,30	P02931	OmpF (porin F)	112	10	21
M35	37,63	P0ABC5	Protein hflC	96	15	9
M36	33,99	P0AAJ6	Formate dehydrogenase (iron- sulfur subunit)	116	28	3
M37	39,30	P02931	OmpF (porin F)	163	41	10

Punto	MW kDa	Código UniprotKB	ID	Score	Cobertura secuencia(%)	RMS error
M38	39,30	P02931	OmpF (porin F)	91	3	23
M39	34,76	A8A550	p-hydroxybenzoic acid efflux pump (subunit aaeA)	96	26	18
M40	42,83	B7ULG1	L-lactate dehydrogenase	101	18	29
M42	40,95	B1LNH0	4-hydroxy-3-methylbut-2-en- 1-yl diphosphate synthase	83	21	36
M43	33,12	P45548	Phosphotriesterase homology protein	71	8	35
M44	37,29	P0A911	OmpA (porin A)	225	37	7
M45	27,37	P07014	Succinate dehydrogenase (iron-sulfur subunit)	187	44	6
M47	46,78	A7ZRT7	Multifunctional CCA protein	103	14	42
M49	37,29	P0A911	OmpA (porin A)	220	44	6
M50	14,43	P09162	yjaA uncharacterized protein	88	51	26
M51	29,69	Q8X6T6	tRNA pseudouridine synthase C	98	29	27
M52	19,43	A7ZTU7	ATPase (delta subunit)	57	14	24
M53	21,31	P0AGD5	Superoxide dismutase (Fe)	84	35	13
M54	20,86	P0AE10	Alkyl hydroperoxide reductase (subunit C)	116	41	26
M56	31,11	Q8XBT6	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase A	111	28	48
M58	17,31	A7ZTU8	ATPase (b subunit)	149	55	8
M59	17,31	A7ZTU8	ATPase (b subunit)	170	55	8
M60	17,31	A7ZTU8	ATPase (b subunit)	229	62	8
M61	17,31	A7ZTU8	ATPase (b subunit)	215	46	13

Punto	MW kDa	Código UniprotKB	ID	Score	Cobertura secuencia(%)	RMS error
M62	19,47	P0A9A0	Ferritin	143	26	14
M63	18,48	P0ABD4	Bacterioferritin	233	78	8
M64	14,95	P0ADW5	Putative cytochrome bd ubiquinol oxidase (subunit III)	137	68	6
M65	14,95	P0ADW5	Putative cytochrome bd ubiquinol oxidase (subunit III)	90	46	3
M66	11,88	P0ADZ9	yajC UPF membrane protein	64	18	8
M67	50,35	A7ZTU4	ATPase (beta subunit)	205	36	9
M68	46,48	B7UGW9	Peptidase B	231	39	13
M69	42,84	Q5PLQ7	L-lactate dehydrogenase	148	23	20
M70	42,90	Q5PLQ7	L-lactate dehydrogenase	102	17	3
M71	50,94	P0A9P2	Dihydrolipoamide dehydrogenase	73	10	10

Los datos aportados por estos análisis electroforéticos y mediante espectrometría de masas permitieron estudiar, adicionalmente, la localización subcelular de los complejos y proteínas identificados, así como su función, utilizando las bases de datos Swissprot (<http://www.uniprot.org/>) y CCDB ("CyberCell DataBase", <http://ccdb.wishartlab.com/CCDB/>). El resultado porcentual de dicho estudio se muestra en la **Figura 33**.

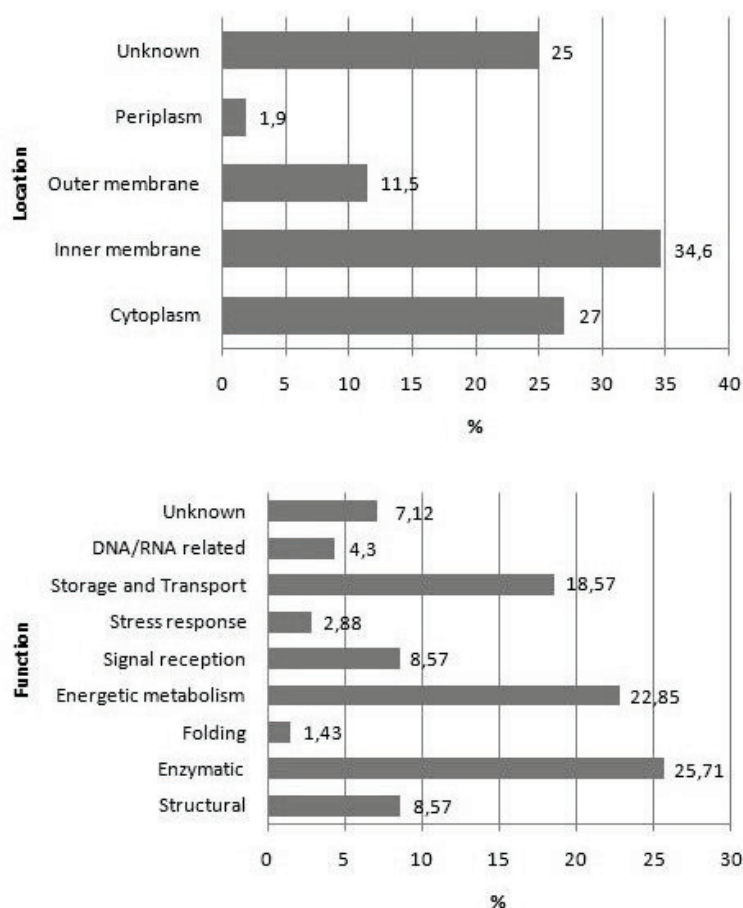


Figura 33. Localización y función porcentual de las proteínas de OMVs de *E. coli* identificadas por espectrometría de masas.

Las proteínas más abundantes en la muestra de OMVs analizadas fueron aquellas de localización citoplasmática (27%), seguidas de las proteínas de membrana interna (34,6%) y las proteínas de membrana externa (11,5%), que en conjunto sumaron un 81% del total, mientras que el 19% restante se reparte entre proteínas periplasmáticas (1,9%) y proteínas para las cuales las bases de datos utilizadas no definen una localización específica (25%).

Por otro lado, las funciones predominantes entre las proteínas identificadas en los tres análisis electroforéticos fueron las proteínas enzimáticas (25,7 %), las proteínas del metabolismo energético (22,9 %) y las proteínas de almacenamiento y transporte (18,6 %), en conjunto el 67 % del total. El restante 33 % se encuentra repartido entre proteínas de función estructural, proteínas de señalización, proteínas de unión o procesado de DNA y RNA, proteínas de estrés y proteínas que participan en el ensamblado de proteínas. También es destacable el 7% de proteínas para las cuales las bases de datos empleadas no ofrecieron una función.



2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE *SERRATIA MARCESCENS*.

2.1. Análisis electroforético e identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF

Con el objetivo de analizar el complexoma de envuelta celular de *Serratia marcescens*, las OMVs extraídas utilizando la prensa de French fueron sometidas a un análisis electroforético mediante electroforesis nativa hrCNE.

En un primer análisis electroforético, se llevó a cabo una hrCNE utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo. La finalidad de dicho análisis fue la separación de los diferentes complejos proteicos ubicados en las OMVs en unas condiciones lo suficientemente suaves como para mantener la interacción entre sus componentes.

La **Figura 34** muestra el perfil proteico obtenido de la 1D hrCNE.

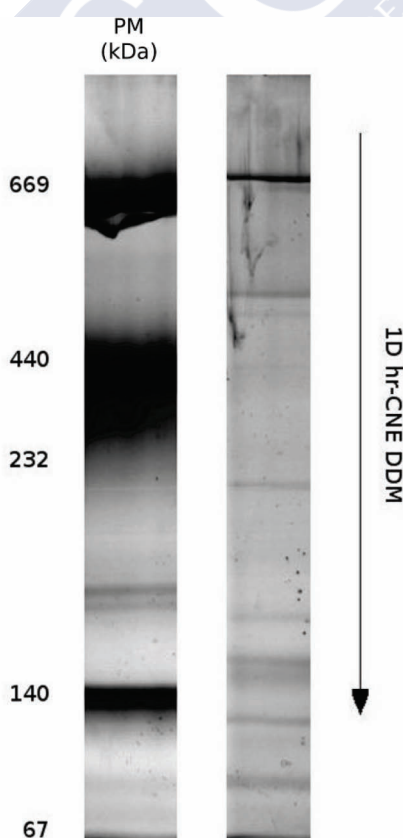


Figura 34. Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de *Serratia marcescens* obtenido utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo.

Con el objetivo de resolver posibles co-migraciones de los complejos proteicos en la 1D, se realizó un análisis electroforético bidimensional en condiciones nativas 2D hrCNE/hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo de la 1D, y otro detergente no iónico diferente en la 2D. Se realizaron ensayos previos con diferentes detergentes no iónicos (Tritón X-100, digitonina y octil- β -glucopiranosido), pero la mejor resolución y definición de complejos fue obtenida con el TX-100. El análisis electroforético nativo 2D hrCNE/hrCNE permite observar las diferencias de movilidad electroforética de los complejos separados en relación al detergente no iónico utilizado en el tampón de cátodo, así como determinar qué complejos proteicos forman las principales bandas de la 1D.

La **Figura 35** muestra el mapa bidimensional obtenido.

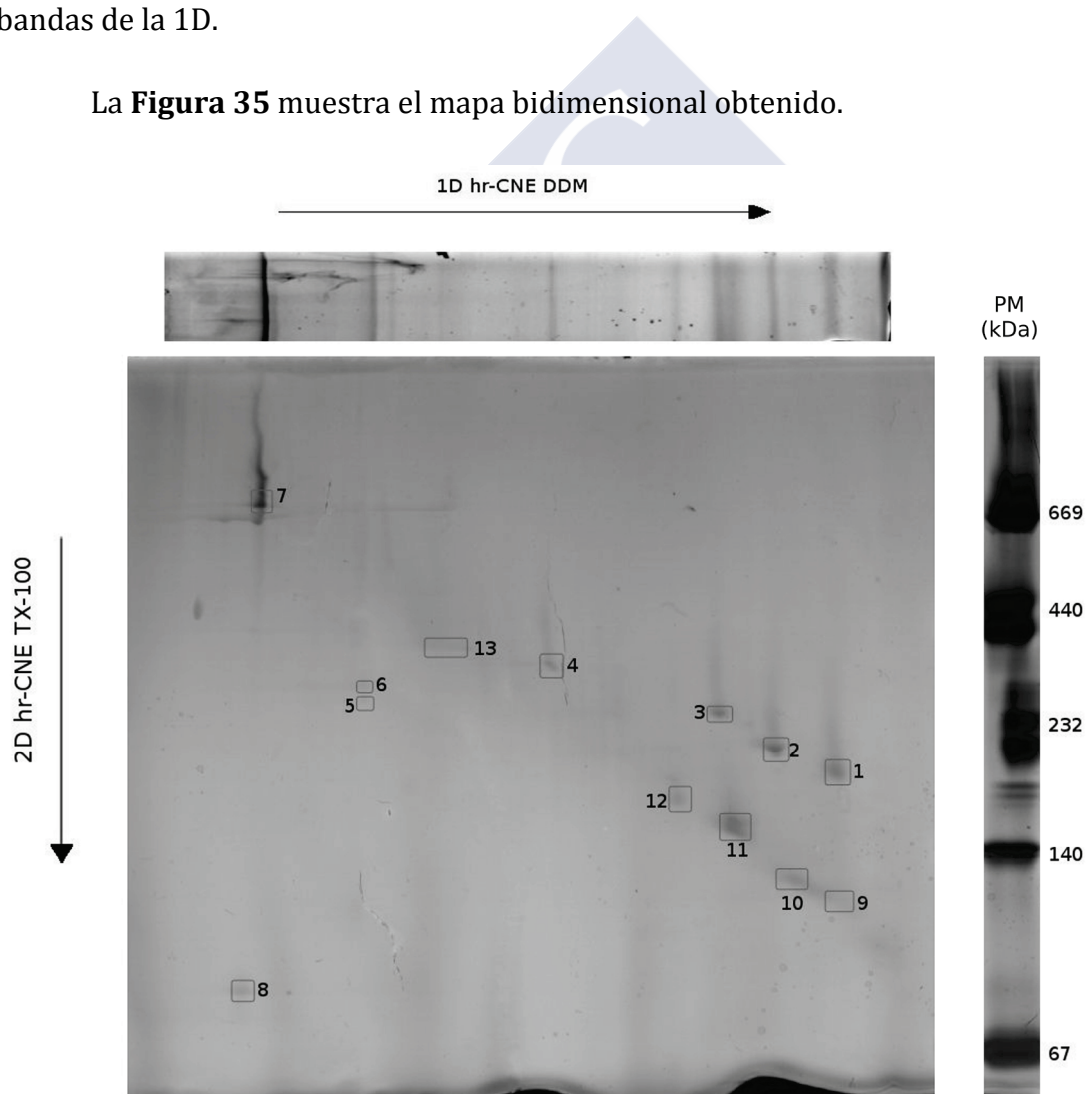


Figura 35. Mapa bidimensional de OMVs de *S. marcescens* obtenido mediante análisis electroforético 2D hrCNE/hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en la 1D, y TX-100 en la 2D. La 1D se corresponde con la mostrada en la **Figura 34**.

En el mapa proteico mostrado en la **Figura 35** se pueden observar diferentes tipos de puntos según su posición: aquellos cuya movilidad electroforética no depende del tipo de detergente no iónico utilizado en el tampón de cátodo (DDM o TX-100, en este caso), y que son reconocibles por dibujar una diagonal de izquierda a derecha, arriba-abajo, es decir, de mayor a menor movilidad electroforética; y aquellos cuya movilidad electroforética si varía en función del detergente no iónico utilizado, situándose estos o bien por encima o por debajo de dicha diagonal.

De entre los puntos presentes en la **Figura 35**, se escindieron 13 de ellos, algunos situados por encima o por debajo de la diagonal, es decir, los que mostraban una movilidad electroforética diferente en relación al detergente no iónico utilizado en el tampón de cátodo, y otros situados en la misma diagonal, para proceder a continuación a su análisis por espectrometría de masas mediante “peptide mass fingerprinting” MALDI-TOF/TOF. Dichos puntos fueron denominados anteponiendo la letra T a la numeración. De los 13 puntos seleccionados, todos resultaron en una identificación positiva, y el resultado de dichas identificaciones se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Identificación por MALDI-TOF/TOF de los principales componentes de las OMVs de *S. marcescens* detectadas mediante 2D hrCNE/hrCNE.

Punto	MW kDa	Código Uniprot KB	ID	Péptidos	Score	Cobertura de secuencia (%)
T1	58,02	D4E9I9	Cytochrome d ubiquinol oxidase (subunit I)	4	230	10
T2	39,65	A8GFQ0	Porin Gram-negative type	2	115	8
T3	74,54	D4E9I9	Cytochrome d ubiquinol oxidase (subunit I)	3	221	3
T4	88,74	G0BFV2	YaeT protein (outer membrane protein assembly complex)	13	282	20
T5	55,4	A8G7M6	ATPase (alfa subunit)	5	123	9

Punto	MW kDa	Código Uniprot KB	ID	Péptidos	Score	Cobertura de secuencia (%)
T6	46,17	Q0GKR1	ATPase (beta subunit)	8	124	25
T7	56,75	O66206	Chaperonine GroEL	13	458	30
T8	56,75	O66206	Chaperonine GroEL	8	400	17
T9	50,85	A8GJ14	Dihydrolipoamide dehydrogenase	4	165	12
T10	50,85	A8GJ14	Dihydrolipoamide dehydrogenase	10	454	23
T11	99,59	E9CLS6	Decarboxylase component E1 (pyruvate dehydrogenase)	11	149	14
T12	68,5	D1RVY4	Putative protease maturation protein	5	146	11
T13	24,19	D5FN38	50S ribosomal protein L2	4	120	18

2.2. Análisis electroforético e identificación de proteínas en 2D hrCNE/SDS-PAGE por MALDI-TOF/TOF

Con el objetivo principal de caracterizar los componentes de los complejos proteicos contenidos en las OMVs de *S. marcescens*, estas fueron sometidas a un análisis electroforético bidimensional hrCNE/SDS-PAGE, durante el cual los complejos proteicos fueron separados en una 1D por la técnica electroforética nativa hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, y posteriormente sometidos a una 2D en condiciones desnaturalizantes, utilizando la técnica electroforética desnaturalizante SDS-PAGE.

La **Figura 36** muestra el mapa proteico obtenido.

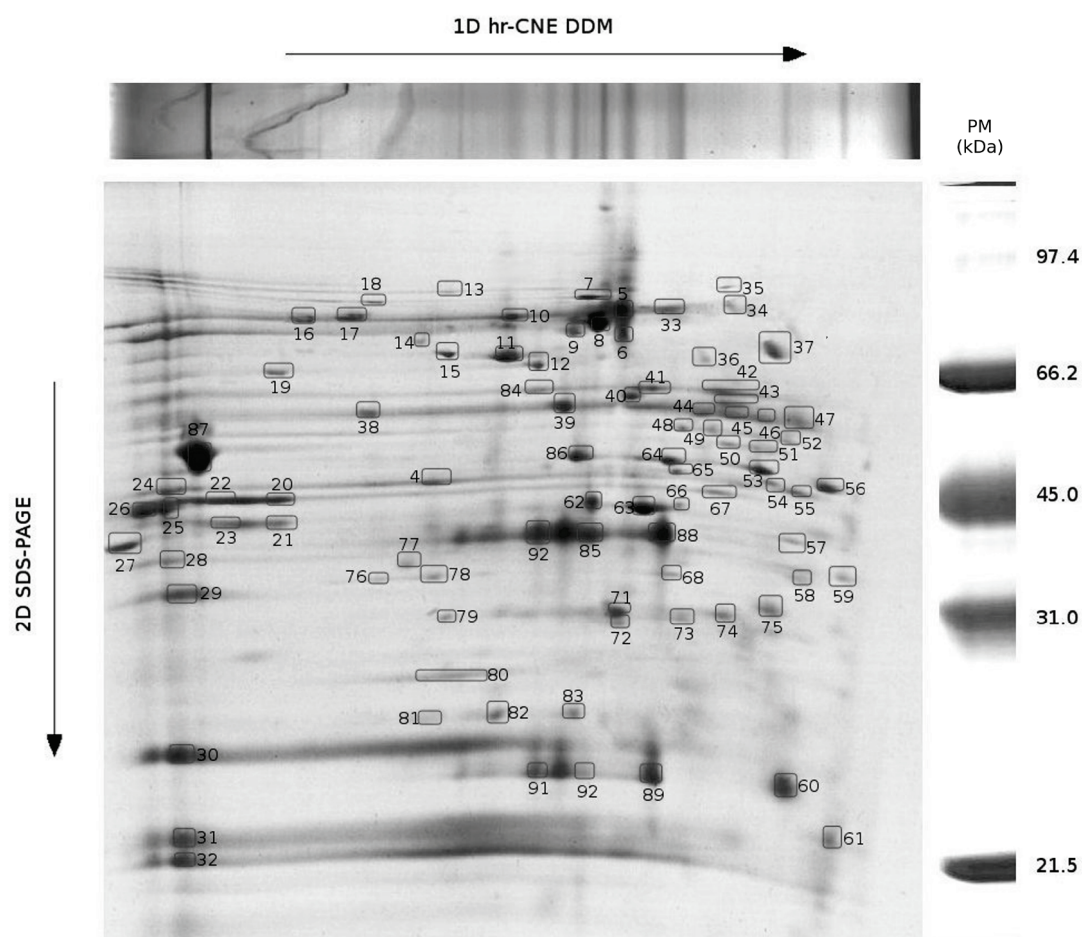


Figura 36. Mapa bidimensional de OMVs de *S. marcescens* obtenido mediante análisis electroforético 2D hrCNE/SDS-PAGE, utilizando DDM como detergente no iónico en la 1D. la 1D se corresponde con la mostrada en la **Figura 34**.

En base al mapa proteico obtenido mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE, se seleccionaron 92 puntos relevantes por su intensidad relativa y/o su localización con respecto a las bandas de la 1D, que fueron posteriormente analizados por espectrometría de masas mediante “peptide mass fingerprinting” MALDI-TOF/TOF. Dichos puntos fueron escindidos del gel y analizados. En este caso, los puntos seleccionados para su identificación fueron denominados mediante números. De los 92 puntos analizados, 70 de ellos dieron lugar a una identificación fiable. Los resultados de estas identificaciones se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Identificación por MALDI-TOF/TOF de los principales componentes de OMVs de *S. marcescens* detectados mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE.

Punto	MW kDa	Código UniprotKB	ID	Score	Cobertura secuencia (%)	RMS error
5	41,27	O33980	OmpF (porin F)	429	22	17
6	41,27	O33980	OmpF (porin F)	191	6	5
7	54,91	D7RJ66	Catalase	167	10	18
8	99,83	D4E1T7	E1 component (piruvate dehydrogenase complex)	271	17	119
9	95,57	A8GA52	Protein disaggregation chaperone	255	16	5
10	105,8	D1RWI5	E1 component (2- oxoglutarate dehydrogenase complex)	154	9	13
11	91,42	A8GGU1	Molybdopterin guanine dinucleotide-containing S/N-oxide reductase	139	12	21
12	73,97	D1S067	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	87	4	1
14	87,73	A8GDR0	Phenylalanyl-tRNA synthetase (beta subunit)	138	11	6
15	88,68	D1RZG7	YaeT protein (outer membrane protein assembly complex)	185	10	24
16	21,88	D4DZR3	Formate dehydrogenase (alfa subunit)	129	11	3
17	113	B8R7R6	Multidrug resistance efflux pump SdeY	196	6	9
19	82,75	C4SMX3	NADP-dependent malic enzyme	115	13	21

Punto	MW kDa	Código UniprotKB	ID	Score	Cobertura secuencia (%)	RMS error
20	55,4	A8G7M6	ATPase (alfa subunit)	450	19	21
21	46,18	Q0GKR1	ATPase (beta subunit)	551	29	13
22	55,4	A8G7M6	ATPase (alfa subunit)	357	18	22
23	46,18	Q0GKR1	ATPase (beta subunit)	382	20	7
24	58,75	A8GCY3	Glucan biosynthesis protein G	122	12	23
25	55,4	A8G7M6	ATPase (alfa subunit)	172	16	24
26	55,17	A8G978	Leucyl aminopeptidase	187	15	14
27	43,91	A8GB82	Dihydrolipoamide succinyltransferase	253	16	4
28	28,66	B6RBE7	Elongation factor Tu A	118	10	11
29	45,63	D4E497	Glucose-1-phosphatase	95	13	13
30	30,11	D1RY77	50S ribosomal protein L2	240	30	20
31	25,85	D1RY74	30S ribosomal protein S3	229	29	22
33	105,8	D1RW15	E1 component (2- oxoglutarate dehydrogenase complex)	159	7	15
34	97,67	D4E9R0	Leucine-tRNA ligase	82	5	4
35	142,1	D4E2S0	Phosphoribosylformyl- glycinamide synthase	88	4	9
36	85,99	A8GGG0	Quinoprotein glucose dehydrogenase	131	6	21
37	78,16	D0FWW2	Elongation factor G	127	9	20
38	77,35	A8GAR3	PpiC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	254	2	9

Punto	MW kDa	Código UniprotKB	ID	Score	Cobertura secuencia (%)	RMS error
39	68,5	D1RVY4	Putative protease maturation protein	152	11	15
40	72,34	A8GIV9	Transketolase	109	13	4
43	68,93	D4DXD1	Chaperone DnaK	150	13	7
44	61,29	D1RP56	30S ribosomal protein S1	96	9	6
45	64,9	A8GB79	Succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	180	16	4
46	64,9	A8GB79	Succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	87	7	24
47	64,9	A8GB79	Succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	127	18	4
48	69,16	E0SKI2	NADH:ubiquinone oxidoreductase (C/D subunit)	103	9	29
49	69,16	E0SKI2	NADH:ubiquinone oxidoreductase (C/D subunit)	90	6	7
50	65,3	A8G9X1	Urocanate dehydratase	178	11	27
52	64,37	D4E9A7	D-lactate dehydrogenase	85	5	2
53	54,7	C4U8F0	Putative uncharacterized protein	132	8	19
55	56,83	A8GKU5	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	128	12	2
56	59,51	A8GKS0	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	392	16	14
58	45,47	D1RX62	Enolase	103	16	5
59	28,66	B6RBE7	Elongation factor Tu A	138	25	8

Punto	MW kDa	Código UniprotKB	ID	Score	Cobertura secuencia (%)	RMS error
60	38,52	D4E838	OmpA (porin A)	369	13	13
61	27,25	A8G9J7	Two-component response regulator (winged hélix family)	251	22	5
62	53,14	P33109	Aspartate ammonia-lyase	207	12	19
63	50,79	A8GJ14	Dihydrolipoamide dehydrogenase	517	24	13
64	54,70	C4U8F0	Putative uncharacterized protein	124	5	8
65	54,70	C4U8F0	Putative uncharacterized protein	87	4	15
66	46,18	Q0GKR1	ATPase (beta subunit)	92	26	9
67	67,25	D2RLW6	ATPase (alfa subunit)	140	11	49
68	41,96	Q7WSD6	Multidrug resistance efflux pump SdeX	112	10	5
71	39,65	A8GFQ0	Porin gramnegative-type	140	15	17
72	43,01	A8GG01	Flagellin domain protein		14	
73	16,69	B5NJP8	OmpN (porin N)	105	10	2
74	47,1	A8GB12	Serine type D-alanyl-D- alanine carboxypeptidase (fraction A)	150	10	12
75	43,36	D4E029	Uroporphyrinogen-III-C- methyltransferase	196	7	8
76	42,04	D1RW12	Multidrug resistance efflux pump	110	16	4
77	48,53	D4E9J8	Citrate (Si)-synthase	244	17	12
78	42,04	D1RW12	Multidrug resistance efflux	110	16	4

Punto	MW kDa	Código UniprotKB	ID	Score	Cobertura secuencia (%)	RMS error
			pump			
79	42,12	Q7CJM5	YfgL protein (outer membrane protein assembly complex)	141	6	4
80	14,17	D4F4S8	PTS system mannose- specific EIIAB component	164	14	7
82	34,89	A8GAQ4	Cytochrome d ubiquinol oxidase (subunit II)	89	6	6
85	34,89	A8GAQ4	Cytochrome d ubiquinol oxidase (subunit I)	204	8	10
86	54,9	D7RJ66	Catalase	384	20	14

Los datos aportados por estos análisis electroforéticos y mediante espectrometría de masas permitieron estudiar, adicionalmente, la localización subcelular de los complejos y proteínas identificadas, así como su función, utilizando la base de datos Swissprot (<http://www.uniprot.org/>). El resultado porcentual de dicho estudio se muestra en la **Figura 37**.

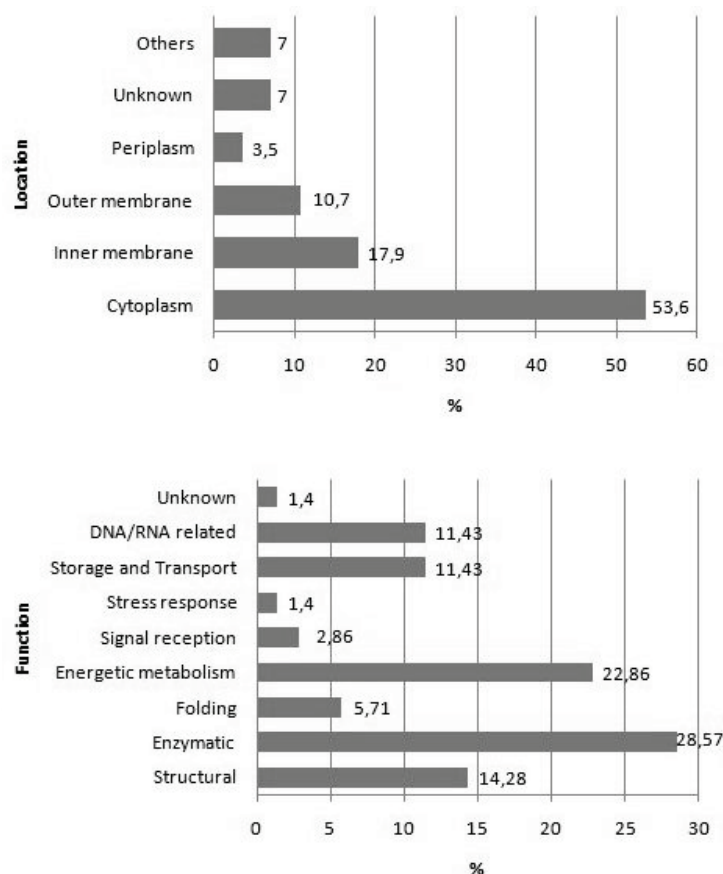


Figura 37. Localización y función porcentual de las proteínas de OMVs de *S. marcescens* identificadas por espectrometría de masas.

Las proteínas más abundantes en la muestra de OMVs analizadas fueron aquellas de localización citoplasmática, puesto que más de la mitad de las proteínas presentaron esta localización (53,6 %), mientras que el restante 46.4% se reparte entre proteínas de membrana interna (17,9 %), proteínas de membrana externa (10,7%), proteínas de periplasma (3,5 %), proteínas con otras localizaciones (7 %) o proteínas para las cuales la base de datos utilizada no define una localización específica (7 %).

Por otro lado, las funciones predominantes entre las proteínas identificadas en los dos análisis electroforéticos fueron las proteínas enzimáticas (28,6 %) y las proteínas del metabolismo energético (22,9 %), en conjunto un 51 % del total. El restante 49% se divide entre proteínas de función estructural (14,3 %), proteínas de unión o procesamiento de DNA y RNA (11,4 %), proteínas de almacenamiento y transporte (11,4 %), y de forma más minoritaria, proteínas de ensamblado (5,7 %), proteínas de señalización (2,9 %) y proteínas de estrés (1,4 %). Además, fueron detectadas proteínas para las cuales la base de datos empleada no ofreció una función (1,4%).



3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE OMVs MEDIANTE CROSS-LINKING

Con el objetivo de identificar componentes minoritarios de complejos proteicos previamente no detectados en otros estudios, se planteó la posibilidad de someter a las OMV de *N. meningitidis* H44/76, *E. coli* y *S. marcescens* a una reacción de “cross-linking” químico, previo a su análisis electroforético mediante la técnica electroforética nativa hrCNE. Los agentes de “cross-linking” químico utilizados fueron el formaldehído, un agente de “cross-linking” clásico, y un agente heterobifuncional, el Sulfo-SBED. Las características específicas de ambos tipos se describen en la **Introducción**. Como objetivo adicional, se pretendía testar la compatibilidad de los agentes de “cross-linking” químico con la técnica electroforética nativa hrCNE.

3.1. Análisis de OMV de bacterias Gram-negativas mediante “cross-linking” químico con formaldehído y hrCNE

El primer agente de “cross-linking” químico utilizado en el análisis del complexoma de OMVs de bacterias Gram-negativas fue el formaldehído, siguiendo el protocolo correspondiente especificado en el capítulo de **Material y Métodos**. Inicialmente, el proceso experimental fue aplicado sobre *N. meningitidis*, por varias razones: en primer lugar, el mapa de su complexoma es menos complejo que el de *E. coli* y *S. marcescens*; en segundo lugar, dicho complexoma ha sido estudiado ampliamente en las últimas décadas; y finalmente, estudios previos habían combinado ya el “cross-linking” químico con formaldehído y el estudio de proteínas de *N. meningitidis*. Por lo tanto, utilizar sus OMVs ofrecía un marco comparativo adecuado.

Tras someter la muestra de OMVs de *N. meningitidis* a la reacción de “cross-linking” con formaldehído, se procedió a realizar un primer análisis electroforético mediante 1D hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo. Como muestra control, fueron utilizadas OMVs de *N. meningitidis* no sometidas al tratamiento con formaldehído.

La **Figura 38** muestra el perfil proteico obtenido de la 1D hrCNE.

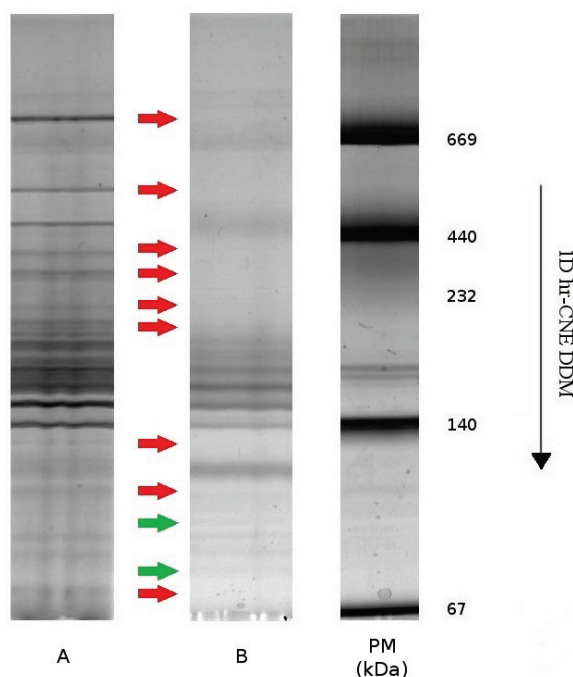


Figura 38. Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de *N. meningitidis* sin tratar (A) y tratadas con formaldehído (B), obtenido con DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo. Las flechas rojas indican pérdida de bandas del perfil tratado con respecto al no tratado, y las verdes, ganancia.

Como podemos observar en la **Figura 38**, se detecta una pérdida de nitidez en las bandas correspondientes al perfil de OMVs tratadas con formaldehído, así como una menor resolución y definición. Algunas bandas desaparecen en el perfil proteico de OMVs tratadas con respecto al control (indicado en la figura con flechas rojas). Dicha pérdida de nitidez y resolución podría deberse a una interacción negativa entre el formaldehído y algún componente de la hrCNE.

Con el objetivo de comprobar la magnitud de dicha interacción, las OMVs de *N. meningitidis* fueron sometidas a dos análisis electroforéticos bidimensional, con el objetivo adicional de observar algún componente previamente no detectado en los complejos de las OMVs de *N. meningitidis*.

En el primero de estos análisis bidimensionales (2D hrCNE/SDS-PAGE), los complejos proteicos fueron separados en una 1D hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, seguido de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes 2D SDS-PAGE. Como muestra control se utilizaron nuevamente OMVs de *N. meningitidis* no sometidas a un tratamiento con formaldehído.

La **Figura 39** muestra los mapas proteicos de OMVs tratadas con formaldehído y no tratadas obtenidos mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE.

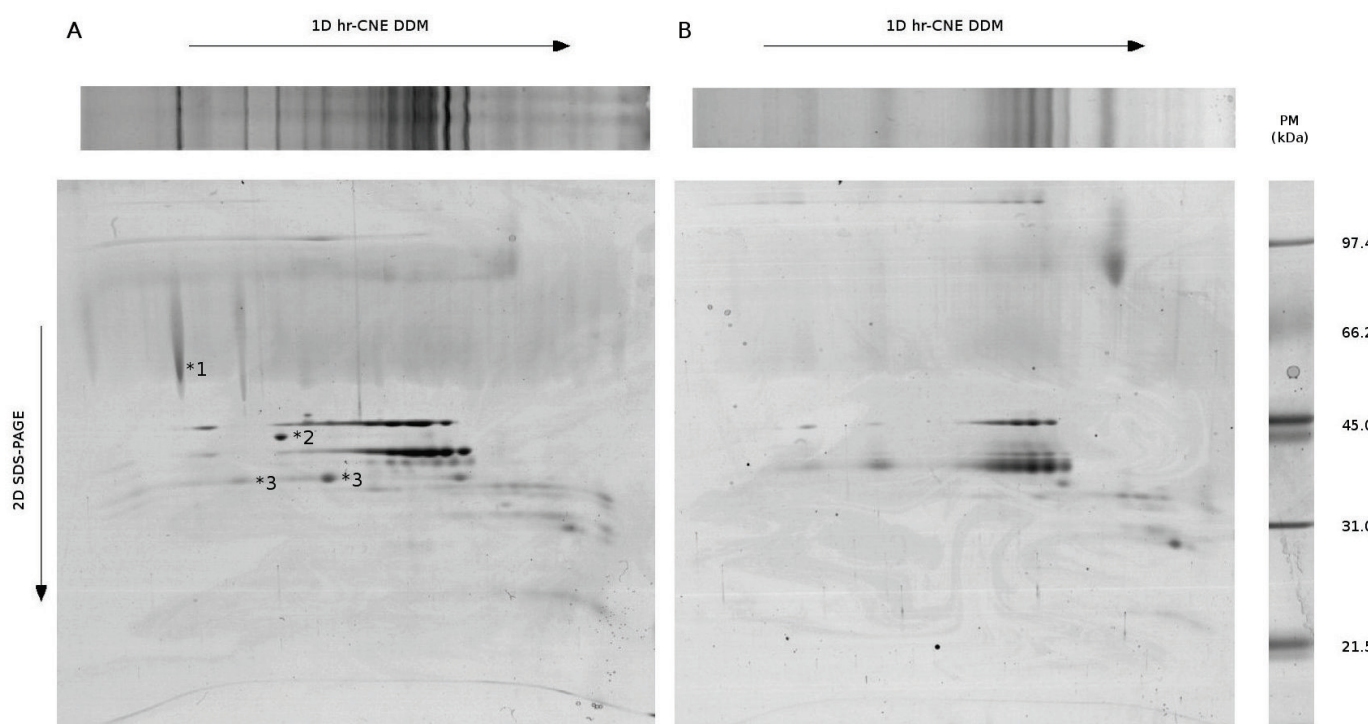


Figura 39. Mapa bidimensional del análisis electroforético 2D hrCNE/SDS-PAG de OMVs de *N. meningitidis* sin tratar (A) y tratadas con formaldehído (B). La numeración *1, *2 y *3 indica complejos presentes en el mapa proteico de OMVs sin tratamiento de formaldehído, y ausentes en el mapa proteico de OMVs tratadas.

En base a los mapas proteicos mostrados en la **Figura 39**, se pudo observar de nuevo la pérdida de resolución mostrada en el perfil proteico 1D hrCNE. En la región central de ambos mapas proteicos, en donde se sitúan los componentes de los complejos de porinas (principales complejos de membrana externa de *N. meningitidis*), se observa una reducción de la resolución que hace que los puntos se

dilatan y que su análisis se dificulte, a pesar de lo cual aparentemente no se revela la presencia de ningún componente adicional a los detectados en trabajos previos⁷². Por el contrario, se observa la pérdida de varios complejos como el de la MSP63 (*1), el de la chaperonina GroEL (*2) y los de la MIP de mayor peso molecular (*3).

En el segundo de estos análisis bidimensionales (2D hrCNE/hrCNE), los complejos proteicos fueron separados en una 1D hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, seguida de una 2D hrCNE, utilizando TX-100 como detergente no iónico en el tampón de cátodo. Como muestra control se utilizaron nuevamente OMVs de *N. meningitidis* no sometidas a un tratamiento con formaldehído. El objetivo de este análisis bidimensional nativo era apreciar diferencias de movilidad electroforética en los complejos separados, así como confirmar definitivamente la interacción del “cross-linking” con formaldehído y la hrCNE.

La **Figura 40** muestra el mapa proteico de OMVs tratadas con formaldehído, obtenido mediante 2D hrCNE/hrCNE. La **Figura 41** muestra una figura de un trabajo anterior en el se he realizó este mismo análisis pero sin el tratamiento.

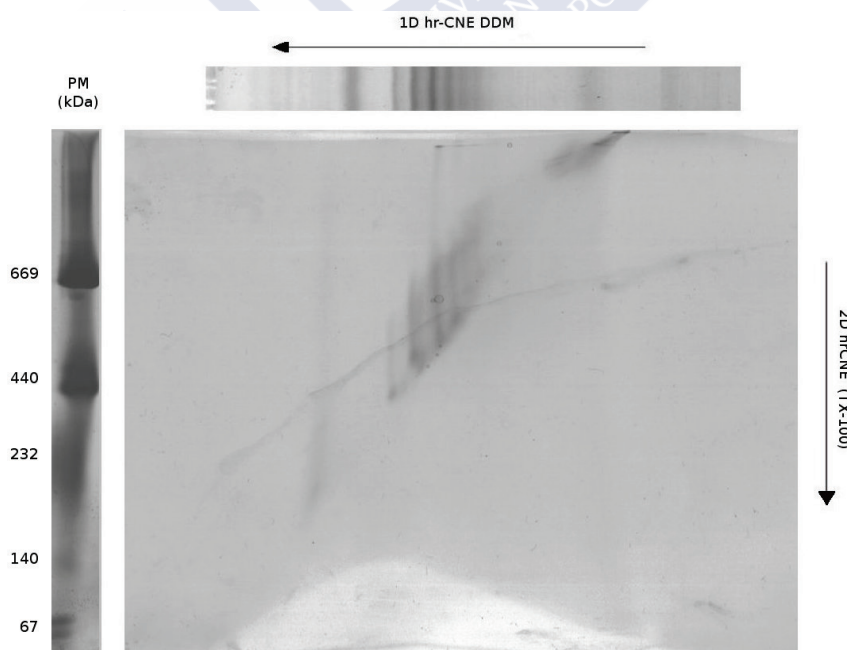


Figura 40. Mapa bidimensional del análisis electroforético 2D hrCNE/hrCNE de OMVs de *N. meningitidis* tratadas con formaldehído.

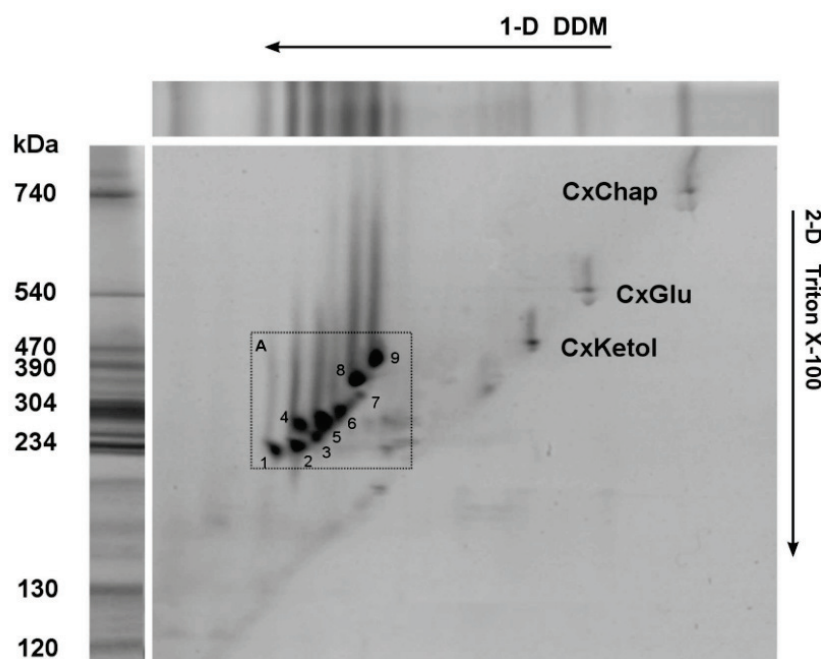


Figura 41. Mapa bidimensional del análisis electroforético 2D hrCNE/hrCNE de OMVs de *N. meningitidis* no sometidas a tratamiento con formaldehído. Imagen tomada de la tesis del Dr. Juan Marzoa Fandiño.

En los mapas proteicos mostrados en la **Figura 40**, se puede observar una distorsión mucho más acusada que en la 2D hrCNE/SDS-PAGE. La región correspondiente a los complejos de porinas aparece tan afectada que su análisis resulta imposible.

Los resultados obtenidos en el “cross-linking” químico de OMVs con formaldehído revela una aparente incompatibilidad del formaldehído y alguno de los componentes de la hrCNE, y/o de una interferencia del formaldehído en la formación de las micelas cargadas negativamente responsables de la movilidad de los complejos durante la electroforesis, de modo que se descartó el análisis de OMVs de *E. coli* y *S. marcescens* utilizando este agente de “cross-linking” químico.

3.2. Análisis de OMV de bacterias Gram-negativas mediante “cross-linking” químico con Sulfo-SBED y hrCNE

El segundo agente utilizado para la reacción de “cross-linking” con las OMVs fue el Sulfo-SBED, siguiendo el protocolo correspondiente especificado en el capítulo de **Material y Métodos**. Se trata de un agente heterobifuncional con diferentes grupos reactivos, así como un brazo espaciador de 14.3 Å, visiblemente mayor que el del formaldehído, de entre 2.3 y 2.7 Å. Existen varios motivos detrás de la elección de este agente. El principal es el objetivo global de este apartado del trabajo experimental: la estabilización de interacciones débiles entre componentes de complejos proteicos contenidos en las OMVs, así como la observación de componentes previamente no detectados electroforéticamente. Otro de los objetivos era el de testar la posibilidad de combinar el tratamiento con Sulfo-SBED y la técnica electroforética nativa hrCNE. La elección del Sulfo-SBED respondió a ciertas ventajas, entre ellas la longitud de su brazo espaciador, que permitiría estabilizar interacciones entre componentes situados a mayor distancia que las que podrían ser estabilizadas por el formaldehído. Otra de las ventajas era la posibilidad de rastrear los componentes proteicos minoritarios involucrados en la interacción, gracias a la molécula de biotina que contiene la estructura del Sulfo-SBED.

El protocolo de uso del Sulfo-SBED fue establecido de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, y también mediante un proceso experimental de puesta a punto que es descrito en el apartado siguiente.

3.2.1. Puesta a punto

La puesta a punto del protocolo de Sulfo-SBED fue realizada, de igual modo que en el caso del formaldehído y por los mismos motivos, utilizando proteínas del serogrupo H44/76 de *N. meningitidis*. Trabajos previos centrados en el proteoma de esta bacteria han demostrado que la proteína RmpM (“Reduction modified protein M”) se une a los complejos de porina B¹⁴⁸, de modo que en el primer paso

¹⁴⁸Freixeiro P, Diéguez-Casal E, Costoya L, Marzoa J, Ferreirós CM, Criado MT, Sánchez S. High resolution Clear Native Electrophoresis (hrCNE) allows a detailed analysis of the heterotrimeric

de la puesta a punto del protocolo, se decidió utilizar estas dos proteínas, la RmpM y la porina B, en un sistema de proteoliposomas para tratar de detectar una interacción ya demostrada previamente.

El esquema de trabajo consistió en marcar la proteína RmpM (en adelante, RmpM*, cuando se encuentre unida a la molécula de Sulfo-SBED), y a continuación utilizar esta proteína marcada en la fabricación de proteoliposomas, que contendrían finalmente ambas proteínas, la RmpM* y la porina B. En el proceso de fotoactivación, tal y como se especifica en el capítulo de **Introducción** y en el de **Material y Métodos**, la molécula de Sulfo-SBED unida a la RmpM* cambiaría su configuración, y se uniría por su extremo libre a las proteínas cercanas, en este caso, la porina B. La molécula de Sulfo-SBED estabilizaría la interacción entre ambas proteínas, lo cual sería analizado posteriormente mediante un análisis electroforético.

El primero de los análisis realizado incluyó la producción de proteoliposomas con RmpM* y la porB, obtenidos siguiendo el protocolo descrito por Freixeiro et al¹⁴⁸. Estos fueron analizados posteriormente mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes 1D SDS-PAGE y un “Western-blotting” en membrana de PVDF, con el objetivo de detectar la señal de biotina. La muestra fue preparada a 70° C durante 5 minutos, con cuatro modificaciones: 1) con DTT y la muestra no fotoactivada, 2) con DTT y la muestra fotoactivada, 3) sin DTT y la muestra no fotoactivada, 4) sin DTT y la muestra fotoactivada.

La **Figura 42** muestra el “Western-blot” de proteoliposomas RmpM*-PorB sometido a 1D SDS-PAGE y revelado con suero de anti-OMVs de *N. meningitidis* H44/76 a dilución 1:1000.

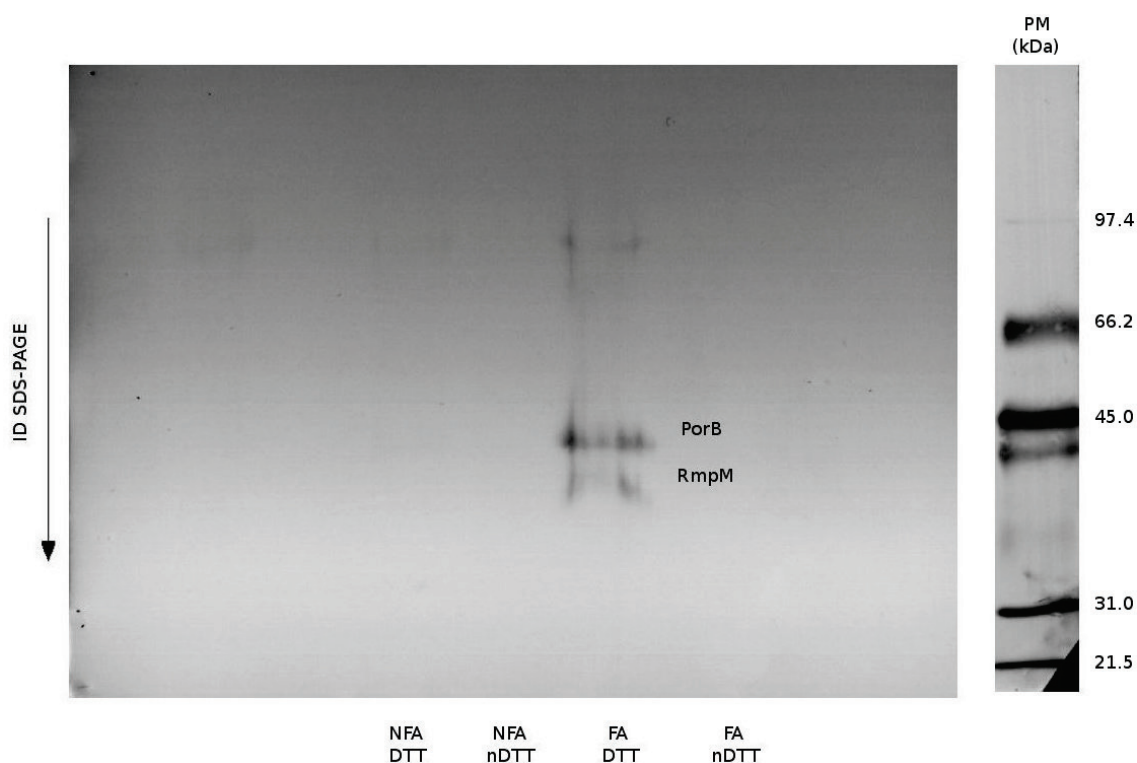


Figura 42. Análisis mediante “Western-blotting” de la eficacia del Sulfo-SBED en la detección de complejos RmpM*-PorB en presencia/ausencia de DTT. NFA: muestra no fotoactivada; FA: muestra fotoactivada; DTT: muestra reducida con DTT; nDTT: muestra no reducida con DTT..

Puede observarse que la señal detectada se corresponde con la muestra que había sido fotoactivada y tratada combinadamente con DTT. La molécula de Sulfo-SBED, unida tanto a la RmpM* como a la porina B, sufre la rotura de su puente disulfuro debido a la acción del agente reductor, de modo que la biotina inicialmente asociada sólo a la RmpM pasa a la porB, indicando por tanto la interacción entre ambas.

El segundo análisis se centró en ensayar diferentes tiempos de fotoactivación, utilizando la misma muestra del ensayo anterior: proteoliposomas RmpM*-PorB, a fin de establecer el tiempo de fotoactivación más adecuado. Los tiempos ensayados fueron 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron globalmente semejantes entre diferentes tiempos de fotoactivación, aunque finalmente el tiempo

seleccionado fue 20 minutos, dado que no falló en ninguna de las réplicas realizadas.

El tercer análisis realizado se llevó a cabo con un cambio de agente reductor, utilizando el β -mercaptoetanol en lugar del DTT (recomendado por el fabricante), con el objetivo de utilizar condiciones lo más semejantes posible al resto de estudios realizados en este trabajo. En este caso en concreto, la muestra de proteoliposomas RmpM*-PorB fue tratada con cinco modificaciones diferentes previamente a su análisis mediante 1D SDS-PAGE y posterior "Western-blotting": 1) no fotoactivada y con β -mercaptoetanol, a 95° C durante 10 minutos, 2) fotoactivada y con β -mercaptoetanol, a 95°C durante 10 minutos, 3) fotoactivada y con β -mercaptoetanol a temperatura ambiente, 4) fotoactivada y sin β -mercaptoetanol, a 95° C durante 10 minutos, y 5) fotoactivada y sin β -mercaptoetanol a temperatura ambiente.

La **Figura 43** muestra el "Western-blot" de proteoliposomas RmpM*-PorB sometido a 1D SDS-PAGE y revelado con suero de anti-OMVs de *N. meningitidis* H44/76 a dilución 1:1000.

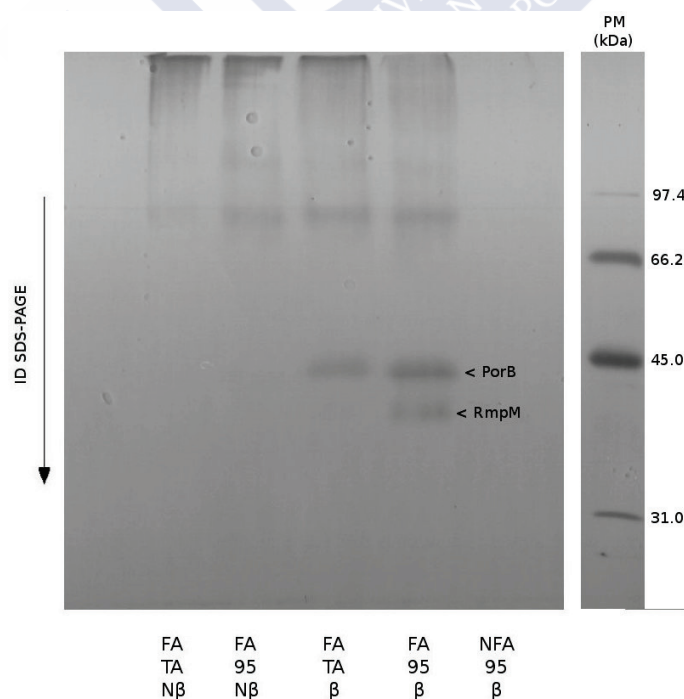


Figura 43. Análisis mediante "Western-blotting" de la eficacia del Sulfo-SBED en la detección de complejos RmpM*-PorB en presencia/ausencia de β mercaptoetanol; NFA: no fotoactivadas; β : con β -mercaptoetanol; N β : sin β -mercaptoetanol; TA: temperatura ambiente. 95: temperatura 95° C.

La señal asociada a la PorB se observa en aquellas muestras que han sido fotactivadas y tratadas con β -mercaptoetanol independientemente de si han sido sometidas a temperatura ambiente o a 95° C, aunque es aparentemente más intensa cuando se trata la muestra a 95° C. La molécula de Sulfo-SBED, unida tanto a la RmpM* como a la porina B, sufre la rotura de su puente disulfuro, debido a la acción del agente reductor, de modo que la biotina pasa de la RmpM a la porina B, indicando por tanto la interacción entre ambas proteínas.

Los resultados obtenidos demostraban la interacción entre la proteína RmpM y la PorB, y que la utilización del β -mercaptoetanol como agente reductor da lugar a una señal menos distorsionada.

El proceso experimental de puesta a punto del protocolo de Sulfo-SBED se dio por finalizado, siendo elegidas como condiciones óptimas de funcionamiento del agente de “cross-linking” las siguientes: 95° C de temperatura, β -mercaptoetanol como agente reductor y 20 minutos de tiempo de fotoactivación

3.2.2. Análisis de OMVs mediante hrCNE

El primer análisis posterior a la puesta a punto del protocolo de “cross-linking” con Sulfo-SBED fue un análisis electroforético 1D hrCNE con OMVs de *N. meningitidis* H44/76, utilizando OMVs no tratadas con Sulfo-SBED como control. Se utilizó DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo.

La **Figura 44** muestra el perfil proteico obtenido mediante 1D hrCNE de OMVs de *N. meningitidis* H44/76 tratadas y no tratadas con Sulfo-SBED.

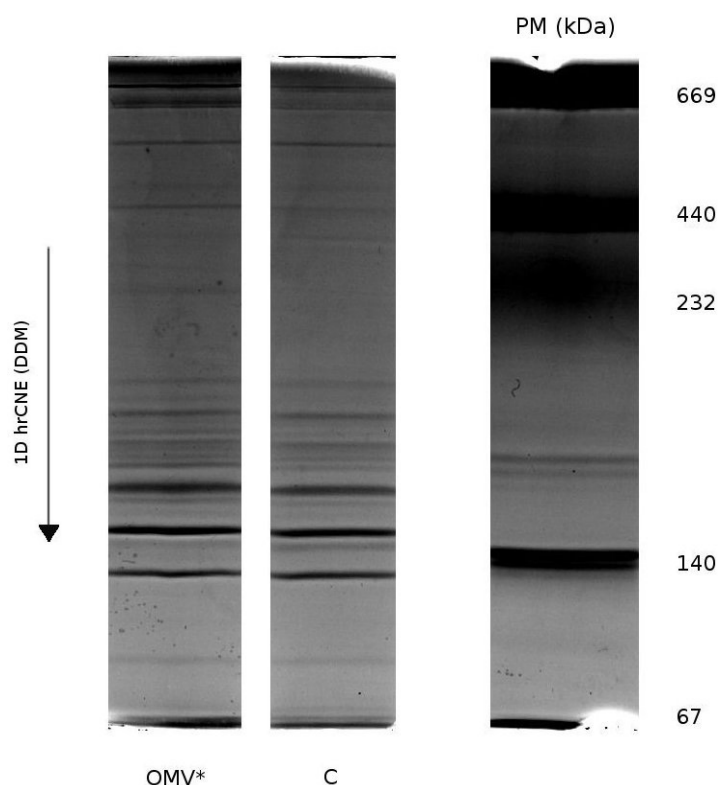


Figura 44. Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de *N. meningitidis* H44/76 tratadas con Sulfo-SBED (OMV*) y no tratadas (C, control), obtenido con DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo.

Como se puede observar en la **Figura 44**, el perfil proteico de las OMVs tratadas con Sulfo-SBED no muestra apenas ninguna variación sustancial con respecto a la muestra control. La resolución es similar, lo cual apoya la compatibilidad del “cross-linking” con Sulfo-SBED y la hrCNE.

El segundo análisis realizado fue una 1D hrCNE de las OMVs de las tres bacterias en las mismas condiciones que las utilizadas en la **Figura 44**. Las OMVs utilizadas en este segundo análisis fueron OMVs tratadas con Sulfo-SBED y fotoactivadas, mientras que las OMVs control no fueron sometidas a ese paso final de fotoactivación. La utilización tanto de OMVs fotoactivadas como no fotoactivadas responde a la intención de trazar la señal de biotina antes y después de que se produzca la fotoactivación, es decir, conocer a qué componente del supuesto complejo se ha unido la molécula de Sulfo-SBED en primer lugar. El procedimiento se describe gráficamente en la **Figura 45**. Después de la 1D en

condiciones nativas, ambos tipos de OMVs son tratados de manera diferencial previamente a la 2D. En el caso de las OMVs fotoactivadas, el tratamiento incluye, como es habitual, un agente reductor. Este agente que rompe la molécula de Sulfo-SBED y hace que la biotina se quede unida a la proteína B. En el caso de las OMVs no fotoactivadas, por el contrario, se utiliza un tampón de muestra sin agente reductor, de modo que la molécula de “cross-linking” no se rompe y la biotina permanece unida a la proteína A. De ese modo, utilizando comparativamente los mapas proteicos y “Western-blots” de ambos tipos de OMVs, obtendremos una señal alterna que marcará las dos proteínas que supuestamente forman parte de un complejo.

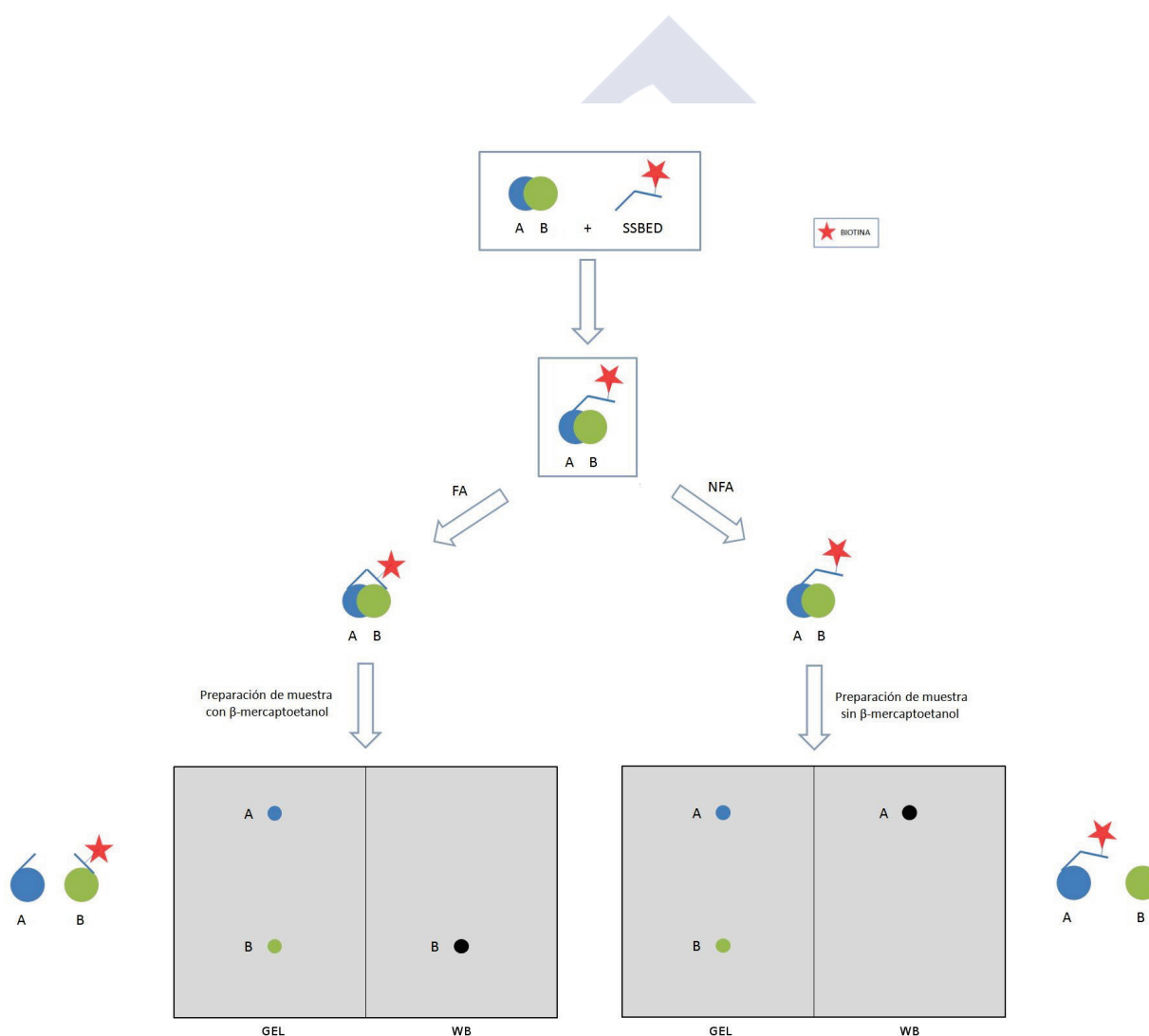


Figura 45. Esquema del proceso experimental empleado para la detección de la transferencia del grupo de biotina del agente Sulfo-SBED entre proteínas asociadas.

En las **Figuras 46, 47 y 48**, se muestran los perfiles proteicos de OMVs fotoactivadas y no fotoactivadas en *N. meningitidis*, *E. coli* y *S. marcescens*, obtenidos mediante 1D hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo.

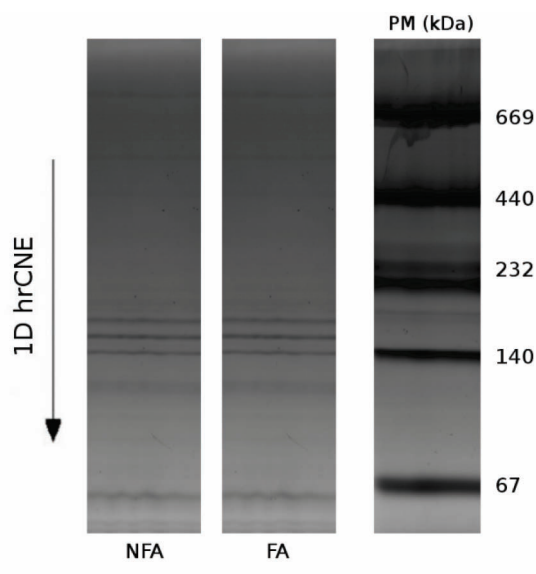


Figura 46. Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de *N. meningitidis* H44/76 tratadas con Sulfo-SBED, fotoactivadas (FA) y no fotactivadas (NFA), utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, y deoxicolato sódico como detergente aniónico.

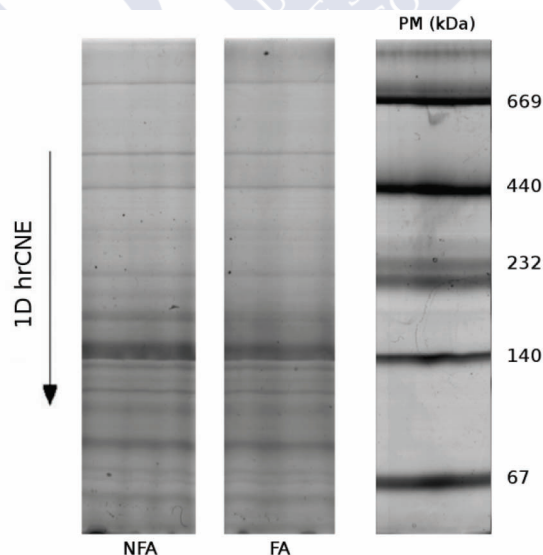


Figura 47. Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de *E. coli* tratadas con Sulfo-SBED, fotoactivadas (FA) y no fotactivadas (NFA), utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, y deoxicolato sódico como detergente aniónico.

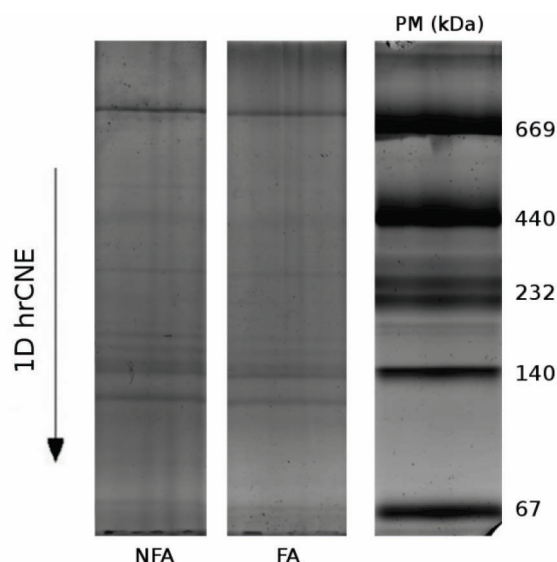


Figura 48. Perfil electroforético de la 1D hrCNE de OMVs de *S. marcescens* tratadas con Sulfo-SBED, fotoactivadas (FA) y no fotactivadas (NFA), utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, y deoxicolato sódico como detergente aniónico.

Con el fin de comprobar si una 2D permitía observar diferencias no detectadas en la 1D, se realizó un tercer análisis, en el que las OMVs de *N. meningitidis*, *E. coli* y *S. marcescens* fueron sometidas a un análisis electroforético bidimensional 2D hrCNE/SDS-PAGE, seguido de una transferencia del gel a una membrana de PVDF mediante “Western-blotting”. El objetivo de este análisis fue caracterizar los componentes de los complejos proteicos separados en la 1D y observar componentes previamente no detectados. La 1D se realizó por tanto con las mismas condiciones que los análisis previos, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo. La tira de gel conteniendo los complejos proteicos separados fue sometida a un tratamiento desnaturalizante (con β -mercaptoetanol) en el caso de las OMVs fotoactivadas, y un tratamiento no desnaturalizante (sin β -mercaptoetanol), en el caso de las OMVs no fotoactivadas, tal y como se explica en la **Figura 45**. En ambos casos, se realizó un tratamiento de las tiras a 95° C durante 10 minutos, difiriendo en la presencia o no de agente reductor. El contenido proteico del gel de la 2D hrCNE/SDS-PAGE fue transferido a una membrana de PVDF mediante “Western-blotting”, revelada siguiendo el protocolo descrito en el capítulo de **Material y Métodos**.

Las **Figuras 49, 50 y 51** muestran las imágenes de las 2D hrCNE/SDS-PAGE y los “Western-blot” correspondientes para *N. meningitidis*, *E. coli* y *S. marcescens*, respectivamente, y tanto para la muestra fotoactivada como para la no fotoactivada.

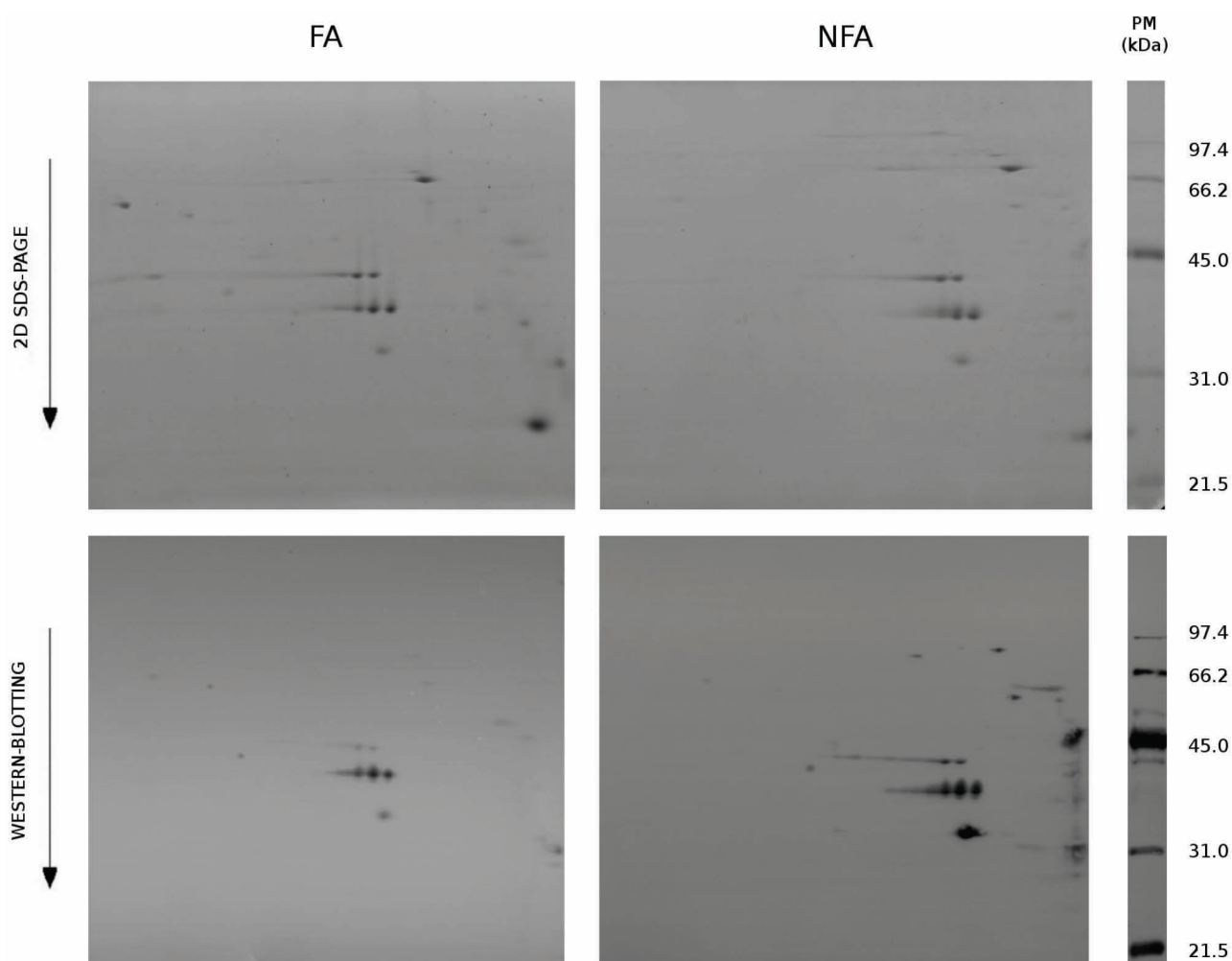


Figura 49. Mapas proteicos obtenidos mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE (arriba) y sus correspondientes “Western-blots” (abajo) de OMVs de *N. meningitidis* fotoactivadas (izquierda) y no fotactivadas (derecha).

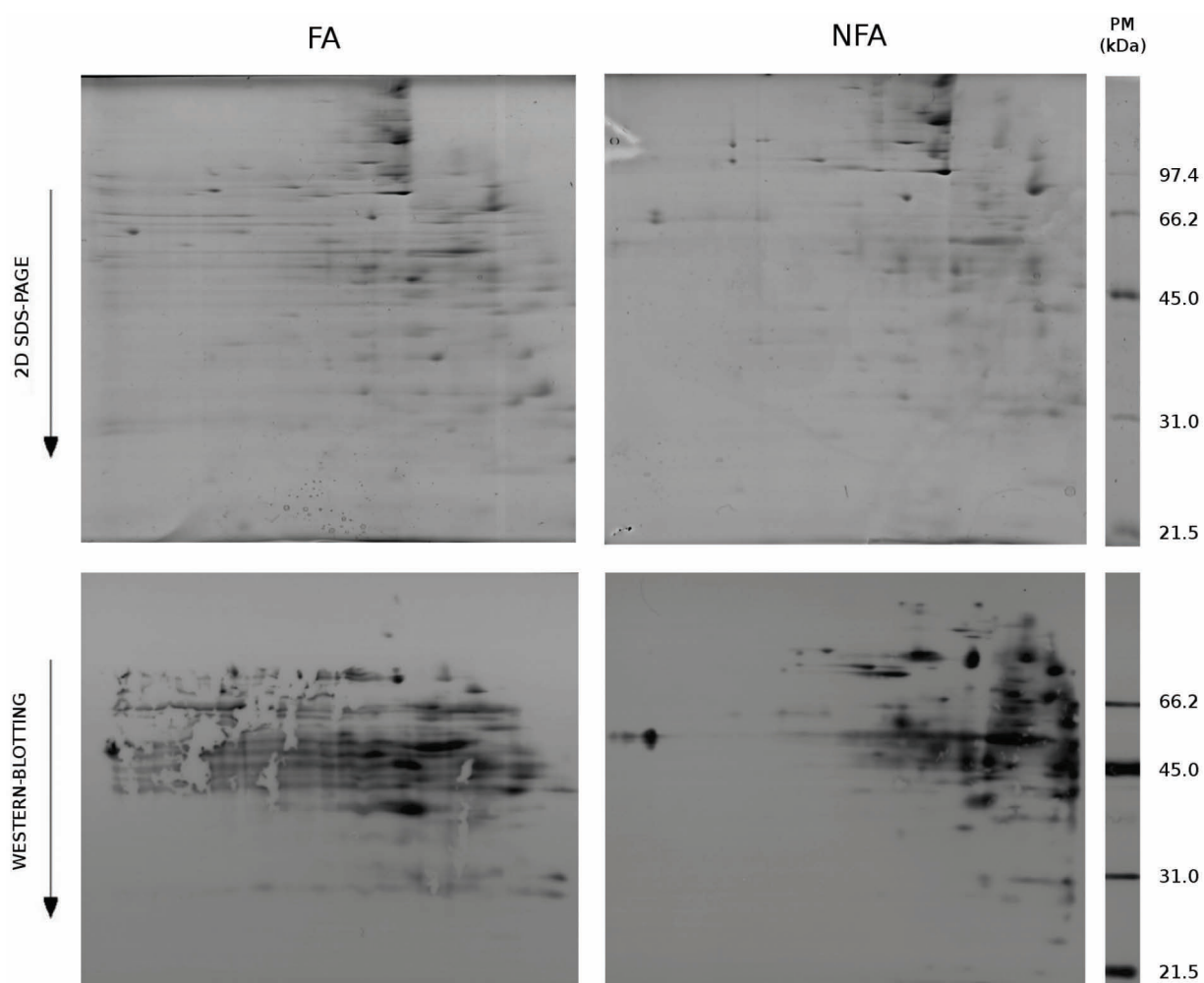


Figura 50. Mapas proteicos obtenidos mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE (arriba) y sus correspondientes “Western-blots” (abajo) de OMVs de *E. coli* fotoactivadas (izquierda) y no fotactivadas (derecha).

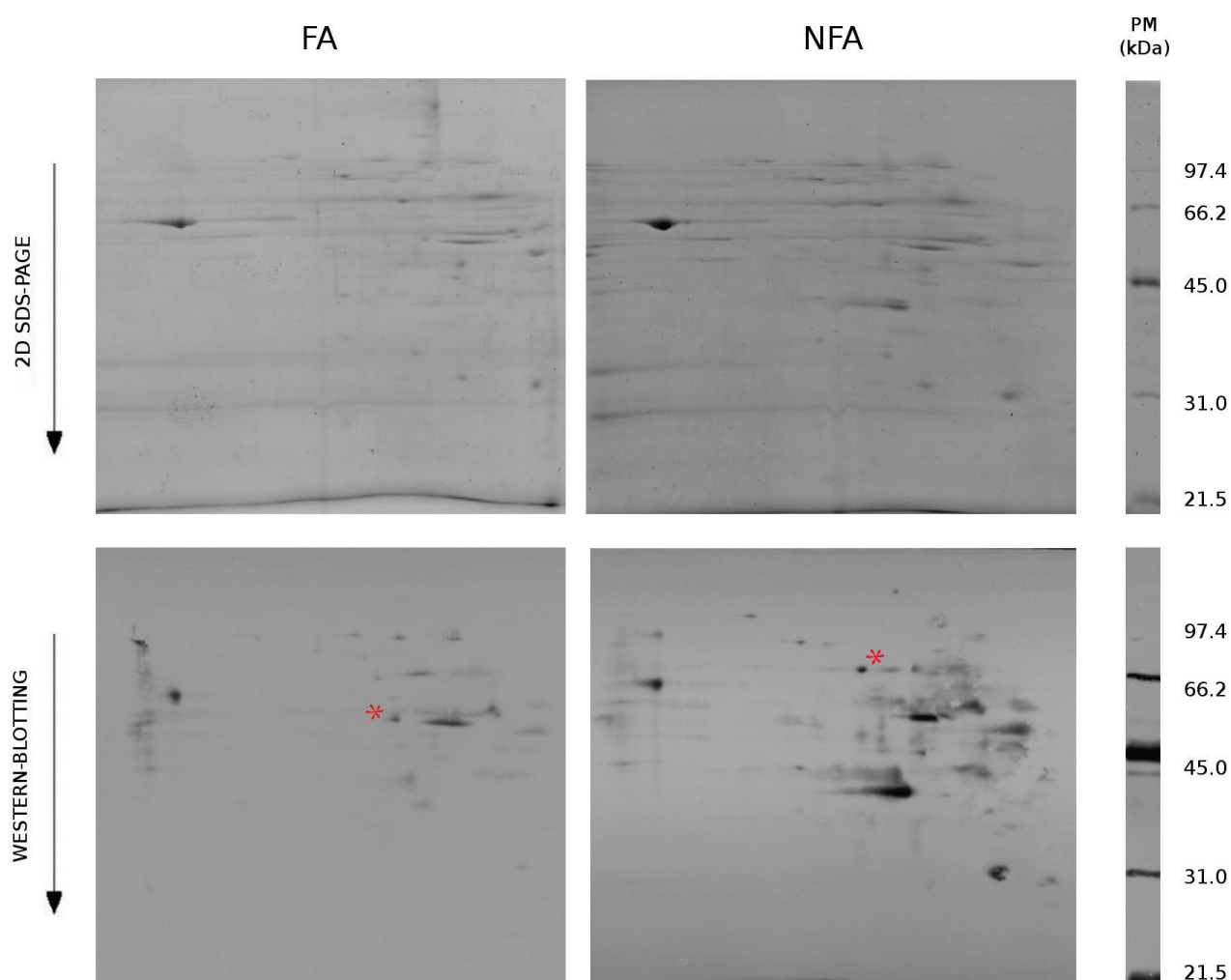


Figura 51. Mapas proteicos obtenidos mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE (arriba) y sus correspondientes “Western-blots” (abajo) de OMVs de *S. marcescens* fotoactivadas (izquierda) y no fotactivadas (derecha). Los puntos señalados con un asterisco rojo se corresponden a posibles componentes de un mismo complejo en los cuales se produce una transferencia de la molécula de biotina.

Los análisis mostrados en las **Figuras 46, 47, 48, 49, 50 y 51** revelan una reducción significativa del contenido proteico, especialmente en las 2D, reducción también observada en los correspondientes “Western-blots”. Además de ello, también se puede observar un efecto a modo de lagunas en los “Western-blots” de *E. coli* y *S. marcescens*, pero no en *N. meningitidis*. Dicho efecto es similar al que se produce cuando queda aire atrapado durante el montaje del “Western-blot”. Como consecuencia se realizaron numerosas réplicas asegurando minuciosamente el contacto entre el gel y la membrana, asegurando la ausencia total de burbujas de aire. Sin embargo, el efecto se presentó de manera reiterada de nuevo, especialmente en *E. coli*, dificultando de manera notable el análisis. A pesar de todo, en el caso de *S. marcescens*, detectamos un posible traslado de la molécula de biotina entre dos proteínas situadas en la misma vertical (indicadas en la **Figura 51** con un asterisco), si bien no hemos podido identificar los puntos correspondientes en los geles de poliacrilamida y el intento de su identificación a partir de la membrana de PVDF fue infructuoso.



DISCUSIÓN

1. COMPLEXOMA DE *ESCHERICHIA COLI*

Al tratarse de un organismo modelo para las bacterias Gram-negativas, y haber sido ampliamente estudiada en proteómica, los conocimientos sobre *E. coli* disponibles ofrecían un marco de comparación muy apropiado para el análisis proteómico realizado en este estudio^{114, 149}.

Para llevar a cabo este estudio del complexoma de la envuelta celular de *E. coli*, se realizó un análisis electroforético mediante 1D hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo (**Figura 30**); y dos análisis electroforéticos bidimensionales: una 2D hrCNE/hrCNE (**Figura 31**), en la cual los detergentes no iónicos más adecuados en la separación de complejos fueron el DDM en la 1D y el OG en la 2D, y una 2D hrCNE/SDS-PAGE, utilizando como detergente no iónico el DDM (**Figura 32**), y un tratamiento desnaturalizante para la 2D. En el caso de la 2D hrCNE/hrCNE, a pesar de ello, se realizaron ensayos con otros detergentes como la digitonina y el TX-100, pero ninguno de ellos ofreció la resolución adecuada. Es necesario apuntar que cada complejo podría presentar una sensibilidad diferente frente a los diferentes detergentes¹⁵⁰, y que la hrCNE es susceptible de ser adaptada en función de los complejos proteicos de interés, mediante la variación del detergente no iónico utilizado tanto en la solubilización de la muestra como en el tampón de cátodo. De ese modo, se podrían estudiar las diferentes características estequiométricas y composicionales de los complejos proteicos de interés. Los hipotéticos complejos proteicos detectados fueron analizados por nanoLC-MS/MS (**Tabla 4, Tabla 5**), mientras que los componentes de dichos complejos proteicos, obtenidos en la 2D hrCNE/SDS-PAGE, se analizaron mediante MALDI-TOF/TOF, siendo identificados 64 puntos de un total de 71 (**Tabla 6**).

La composición aceptada para las OMVs de bacterias Gram-negativas indica que a pesar de su denominación, además de proteínas de membrana externa, contienen también proteínas de membrana interna, citoplasma y periplasma, así

¹⁴⁹Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 5011-5015.

¹⁵⁰Dresler J, Klimentova J, Stulik J. *Francisella tularensis* membrane complexome by blue native/SDS-PAGE. *J Proteomics*. 2011. 75: 257-269.

como trazas de DNA y RNA^{151,152}. Nuestros resultados se ajustan a esta composición. La localización subcelular de las proteínas y complejos identificados (**Figura 33**) se estableció en base a las anotaciones de las bases de datos UniprotKB y CCDB, revelando la presencia de proteínas de membrana externa e interna (46,1 % del total), proteínas citoplasmáticas (27%), y proteínas periplasmáticas (1,9 %). Asimismo, también se detectó un 25% de proteínas para las cuales las bases de datos no ofrecían una localización. Esta distribución coincide con lo observado en el estudio de Pan y colaboradores¹⁵³, a pesar de que la cepa utilizada y el método de extracción empleados difieren de nuestro caso.

En relación a la función desempeñada por las proteínas y complejos proteicos identificados, la mayoría presentan una función enzimática (26%), mientras que el resto se encuentran involucradas en el metabolismo energético celular (23%) y en funciones de almacenamiento y transporte (16%) (**Figura 33**). Se detectan, además, proteínas que interactúan con el DNA y el RNA, lo cual sugiere que estas moléculas están presentes en nuestras OMVs, lo que sugiere que las OMVs podrían estar facilitando la transferencia de material genético a otras bacterias. Estudios proteómicos previos^{1, 5, 154, 155, 156} han revelado que existen familias proteicas presentes de forma mayoritaria en la envuelta celular. Entre las mismas se encuentran las porinas, los componentes de sistemas de secreción y bombas de eflujo, y las chaperonas. Nuestros resultados muestran la presencia de estas mismas familias proteicas, cuya abundancia relativa fue similar a la descrita en otros análisis de *E. coli*.

¹⁵¹Weiner JH, Li L. Proteome of the *Escherichia coli* envelope and technological challenges in membrane proteome analysis. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778: 1698-1713.

¹⁵²Lee EY, Bang JY, Park GW, Choi DS, Kang JS, Kim HJ, Park KS, Lee JO, Kim YK, Kwon KH, Kim KP, Gho YS. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*. 2007. 7: 3143-3153.

¹⁵³Pan JY, Li H., Ma Y., Chen P., Zhao P., Wan SY, Peng X. Complexome of *Escherichia coli* envelope proteins under normal physiological conditions. *Journal of Proteome Research*. 2010. 9: 3730-3740.

¹⁵⁴Stenberg F, Chovanec P, Maslen SL, Robinson CV, Ilag LL, von Heijne G, Daley DO. Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. *J Biol Chem*. 2005; 280: 34409-34419.

¹⁵⁵Lasserre JP, Beyne E, Pyndiah S, Lapaillerie D, Claverol S, Bonneau M. A complexomic study of *Escherichia coli* using two-dimensional blue native / SDS polyacrilamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 2006. 27: 3306-3321.

¹⁵⁶Spelbrink RE, Kolkman A, Slijper M, Killian JA, de Kruijff B. Detection and identification of stable oligomeric protein complexes in *Escherichia coli* inner membranes: a proteomics approach. *J Biol Chem*. 2005. 280: 28742-28748.

Los datos derivados de la identificación por espectrometría de masas revelan la presencia de abundantes porinas de membrana externa. Las porinas presentan una conformación en barril β , formando poros selectivos en la membrana, y la mayoría de ellas se asocian formando trímeros. Están implicadas en el transporte de pequeños metabolitos, constituyen una vía de entrada de antibióticos, y son receptores de bacteriófagos y de anticuerpos protectivos. Las porinas detectadas e identificadas en este estudio son la OmpF, OmpA, PhoE¹⁵⁷ y LamB. Sin embargo, hay que destacar la ausencia de la porina OmpC, una de las más abundantes en *E. coli* junto a la OmpF¹⁵⁸. La ausencia de la OmpC podría atribuirse a su pérdida durante la 1D hrCNE, en la cual solamente pueden ser detectados complejos proteicos y proteínas con un peso molecular aproximado superior a 50 kDa. Sin embargo, esta posibilidad podría descartarse debido a que se ha descrito que la OmpC forma homotrímeros, cuyo peso molecular estaría por encima de dicho valor¹⁵⁹, y además, tampoco detectamos la OmpC (40 kDa) en los análisis 2D hrCNE/SDS-PAGE donde el porcentaje de acrilamida empleado (12%) permite detectar proteínas del peso molecular de la OmpC. Otra explicación a su ausencia podría ser explicada debido a que las porinas OmpC y OmpF se expresan diferencialmente en respuesta a determinados parámetros externos¹⁶⁰. En este sentido, el mecanismo mejor estudiado en el control de la transcripción de las porinas es el que involucra a las proteínas EnvZ y OmpR. La fosforilación de OmpR es esencial en la transcripción de las porinas: un alto nivel de OmpR-P (OmpR fosforilada) estimula el gen *ompC* y reprime el *ompF*, y un bajo nivel de OmpR-P induce la transcripción del gen *ompF*¹⁶¹. Asimismo, un análisis comparativo de los dos tipos de cepas de *E. coli* más ampliamente utilizados, muestran que las cepas B expresan grandes cantidades de OmpF pero no de OmpC, mientras que las cepas

¹⁵⁷Andrä J, de Cock H, Garidel P, Howe J, Brandenburg K. Investigation into the interaction of the phosphoporin PhoE with outer membrane lipids: physicochemical characterization and biological activity. *Med Chem*. 2005. 1: 537-546.

¹⁵⁸Lovelle M, Mach T, Mahendran KR, Weingart H, Winterhalter M, Gameiro P. Interaction of cephalosporins with outer membrane channels of *Escherichia coli*. Revealing binding by fluorescence quenching and ion conductance fluctuations. *Phys Chem Chem Phys*. 2011. 13: 1521-1530.

¹⁵⁹Baslé A, Rummel G, Storici P, Rosenbusch JP, Schirmer T. Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å. *J Mol Biol*. 2006. 362: 933-942.

¹⁶⁰Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, Silhavy TJ. From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1996. 20: 911-917.

¹⁶¹Lan CY, Igo MM. Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *J Bacteriol*. 1998. 180: 171-174.

K-12 expresan ambas¹⁶². Se ha descrito, también, que las cepas B producen una mayor cantidad de OmpF que las cepas K-12, debido a que el genoma de las primeras carece del gen *micF*, el cual post-trascripcionalmente evita la producción de OmpF¹⁶³. En base a esto, creemos que la cepa utilizada en este estudio podría carecer del gen *micF*, y tener el mismo comportamiento que las cepas de tipo B en lo que concierne a la expresión de la OmpF y OmpC.

Como se ha descrito previamente en *N. meningitidis*⁷², la movilidad electroforética de los complejos de porinas parece ser dependiente del detergente no iónico utilizado en el tampón de cátodo. Esto es evidente para los complejos de porinas OmpF y LamB. En el caso de las porinas OmpA y PhoE, estas no fueron detectadas cuando el detergente no iónico utilizado fue el DDM. Otras proteínas que presentaron una movilidad electroforética variable en relación al detergente no iónico utilizado fueron la ferritina y las subunidades de la citocromo d ubiquinol oxidasa. En el caso particular de las porinas, se observó que su movilidad electroforética se incrementaba cuando el detergente utilizado fue el OG, mientras que las subunidades de la citocromo d ubiquinol oxidasa mostraron una movilidad reducida con este detergente, lo cual ocurre de forma semejante en el caso de *S. marcescens* con el TX-100 como detergente no iónico, como se mostrará en la siguiente sección de la **Discusión**.

La porina más abundante en nuestros análisis fue la OmpF. Esta porina fue identificada formando dímeros en los puntos M5 y M6, y monómeros en los puntos M34, M37 y M38. En la misma vertical dibujada por estos puntos, encontramos complejos de dihidrolipoamida dehidrogenasa (DLDH), probablemente también formando dímeros. La DLDH es el componente E3 del complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), junto con los componentes E1 (piruvato deshidrogenasa /decarboxilasa) y E2 (dihidrolipoil acetiltransferasa). Como se explica en la **Introducción**, se considera que los puntos que forman una vertical en una 2D desnaturalizante podrían corresponderse con diferentes miembros de un mismo

¹⁶²Yoon SH, Han MJ, Jeon H, Lee CH, Xia XX, Lee DH, Shim JH, Lee SY, Oh TK, Kim JF. Comparative multi-omics systems analysis of *Escherichia coli* strains B and K-12. *Genome Biology*. 2012. 13: R37.

¹⁶³Schneider D, Duperchy E, Depeyrot J, Coursange E, Lenski R, Blot M. Genomic comparisons among *Escherichia coli* strains B, K-12 and O157:7 using elements as molecular markers. *BCM Microbiol* 2002. 2:18

complejo proteico. Esta regla de la verticalidad no es definitiva, debido a que podría ocurrir que dos complejos proteicos diferentes presentasen la misma movilidad electroforética en la 1D, de modo que sus componentes se encontrarían en la misma vertical del mapa proteico de la 2D desnaturizante, sin que de hecho formen parte del mismo complejo. Por tanto, podría ocurrir que los complejos de OmpF migrasen a la misma velocidad que los de la DLDH. Sin embargo, ambas proteínas fueron detectadas en la misma vertical en los puntos M22 y M34, junto al componente E2, e identificadas por nanoLC-MS/MS en el D20 de la 1D hrCNE, lo cual sugiere que podría existir una relación entre ambas. La DLDH es una proteína clásicamente involucrada en la conversión de los 2-oxoácidos en sus derivados acil-CoA, un proceso de tres pasos, pero también se ha demostrado que presenta otras funciones^{164,165}. Así, se ha propuesto que podría estar involucrada en la regulación del transporte de galactosa, maltosa y ribosa a través de la membrana de *E. coli*. Además, las bacterias DLDH-negativas son avirulentas en los modelos animales utilizados, de modo que podría desempeñar un papel en la virulencia celular. También se ha descrito¹⁶⁶ que la DLDH pneumocócica es crítica para el metabolismo del transporte de galactósido y galactosa, y que las mutaciones del gen de la DLDH generan una producción disminuida de la cápsula. Por otro lado, se sabe que la porina OmpF está implicada en el transporte de diferentes moléculas, pero no hay referencias previas que indiquen una posible relación entre la OmpF y la DLDH, de modo que esta debería ser estudiada en profundidad.

La segunda porina más abundante en nuestros resultados fue la maltoporina o LamB¹⁴. Esta proteína está involucrada en el transporte de maltosa y maltodextrina, y funciona como receptor de muchos bacteriófagos, entre ellos el Lambda. Los complejos de maltoporina detectados muestran que su movilidad electroforética es ligeramente menor que la de los complejos de porinas OmpF. La tercera porina presente en nuestros resultados es la OmpA. Esta porina pertenece

¹⁶⁴**Richarme G, Heine HG.** Galactose- and maltose- stimulated lipoamide dehydrogenase activities related to the binding-protein-dependent transport of galactose and maltose in toluenized cells of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 1986. 156: 399-405.

¹⁶⁵**Richarme G.** Lipoic acid provokes inhibition and aggregation of the maltose binding protein of *Escherichia coli*. *Biochem Int.* 1986. 12: 897-903.

¹⁶⁶**Smith AW, Roche H, Trombe MC, Briles DE, Hakansson A.** Characterization of the dihydrolipoamide dehydrogenase from *Streptococcus pneumoniae* and its role in pneumococcal infection. *Mol Microbiol.* 2002. 44: 431-448.

al grupo de las proteínas de membrana externa modificables por calor ("heat-modifiable family") de *E. coli*, y participa en la estabilización de la membrana externa, actúa como receptor de fagos y colicinas. También juega un papel en la conjugación, media la virulencia y la patogenia celulares, y es una diana importante de la respuesta inmune¹⁶⁷. Su conformación, al igual que otras porinas, es en barril β ¹⁶⁸. La OmpA fue purificada originalmente en 1977, con una masa molecular de 33 kDa¹⁶⁹, aunque posteriormente otros estudios han establecido su masa molecular en un rango que va de los 28 a los 36 KDa, en relación a la temperatura y las condiciones previas a la SDS-PAGE¹⁴⁶: si la muestra se calienta o no, es decir, si es o no desnaturalizada¹⁷⁰. Por el contrario, aunque nuestra muestra fue calentada previamente a la electroforesis, identificamos la OmpA en condiciones desnaturalizantes en dos puntos diferentes (M49 y M44), con un peso aproximado de 31 y 34 kDa, respectivamente, lo cual se correspondería con el monómero desnaturalizado y no desnaturalizado, formas ya descritas previamente^{171, 172}. Asimismo, aunque se cree que es monomérica *in vivo*, se ha descrito que cuando la OmpA se re-ensambla en cantidades limitantes del surfactante DDM (cerca de su valor CMC ("Critical Micelle Concentration")), presenta una alta preferencia por formar oligómeros plegados y no plegados¹⁷². La OmpA fue encontrada en un punto a la altura de 75 kDa en la 1D hrCNE, sugiriendo que podría estar formando homodímeros. A pesar de que la movilidad electroforética en la hrCNE podría no corresponderse con la masa molecular real, la detección de homodímeros concuerda con un estudio previo realizado mediante BNE de complejos proteicos de la envuelta de *E. coli*¹⁵⁵. En el estudio realizado mediante BNE, se utilizó el DDM en el tampón de muestra, mientras que en nuestro estudio estaba presente tanto en el tampón de muestra como en el tampón de cátodo en concentraciones superiores a su valor CMC. Por lo tanto, no podemos concluir si los dímeros

¹⁶⁷**Zakharian E, Reusch RN.** Outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms temperature-sensitive channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 2003. 555: 229-235.

¹⁶⁸**Pautsch A, Schulz GE.** Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol.* 1998. 5: 1013-1017.

¹⁶⁹**Chai TJ, Foulds J.** Purification of protein A, an outer membrane component missing in *Escherichia coli* K-12 ompA mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1977. 493: 210-215.

¹⁷⁰**Kleinschmidt JH.** Folding kinetics of the outer membrane proteins OmpA and FomA into phospholipid bilayers. *Chem Phys Lipids.* 2006. 141: 30-47.

¹⁷¹**Dornmair K, Kiefer H, Jähnig F.** Refolding of an integral membrane protein. OmpA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1990. 265: 18907-18911.

¹⁷²**Wang H, Andersen KK, Vad BS, Otzen DE.** OmpA can form folded and unfolded oligomers. *Biochim Biophys Acta.* 2013. 1834: 127-136.

detectados en las OMV (pero no trímeros) son oligómeros reales o si son artificios como consecuencia del tratamiento con DDM tanto durante la electroforesis como previamente a la misma.

Entre las proteínas detectadas encontramos otro canal de membrana externa, el TolC. Esta proteína es el componente de membrana externa del sistema de secreción de Tipo I, y su función es compartida por varios sistemas de transporte que permiten tanto introducir como expulsar sustancias¹⁷³. Uno de estos sistemas es el sistema de eflujo AcrAB, que coopera con TolC en la expulsión de compuestos antimicrobianos. AcrB se localiza en la membrana interna, y captura la sustancia que debe ser expulsada. El paso de la sustancia va de AcrB al exterior celular a través de TolC. AcrA, una proteína periplasmática, actúa como mediadora entre AcrB y TolC. En nuestros resultados no identificamos ni AcrA ni AcrB. Otros estudios, utilizando BNE han identificado una o dos de estas tres proteínas como trímeros independientes, pero aunque se considera que forman un canal continuo a través de la membrana interna y externa, no se ha descrito que su asociación sea estrecha. Ninguno de los estudios mencionados fueron realizados con compuestos antimicrobianos en el medio, de modo que los resultados concuerdan con la idea de que los tres componentes forman trímeros de forma independiente, y se ensamblan durante la extrusión de compuestos. Únicamente se han detectado interacciones estables entre ellas utilizando “cross-linking químico”¹⁷⁴. Otra de las proteínas de membrana externa detectadas es la PgaA¹⁷⁵, otro componente de un sistema de secreción.

A pesar de que la abundancia relativa de varias proteínas de membrana externa es baja, sobre todo si la comparamos con proteínas de membrana interna o citosólicas, su cantidad absoluta es mayor, siendo nuestros resultados consistentes con trabajos previos en los cuales las proteínas de membrana externa fueron las más abundantes y representadas: porinas, chaperoninas y miembros de sistemas de secreción^{152, 155}.

¹⁷³**Buchanan SK.** Type I secretion and multidrug efflux: transport through the TolC channel-tunnel. *Trends Biochem Sci.* 2001. 26: 3 – 6.

¹⁷⁴**Tikhonova EB, Zgurskaya HI.** AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux complex. *J Biol Chem.* 2004. 279: 32116 – 32124.

¹⁷⁵**Itoh Y, Rice JD, Goller C, Pannuri A, Taylor J, Meisner J, Beveridge TJ, Preston JF 3rd, Romeo T.** Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol.* 2008. 190: 3670-3680.

También se observa una abundancia relativamente alta de proteínas involucradas en la maquinaria de producción de energía, con especial presencia de miembros de la cadena de transporte de electrones, y componentes asociados. Del mismo modo que en otros trabajos^{114, 151, 153}, detectamos la presencia de varios componentes de la citocromo bd ubiquinol oxidasa, la ATPasa y otros complejos relacionados con la producción de energía, como la formato deshidrogenasa, la succinato deshidrogenasa y la lactato deshidrogenasa. La citocromo bd ubiquinol oxidasa (CydAB) es una de las dos ubiquinol oxidasas presentes en la cadena respiratoria aeróbica de *E. coli*, expresada predominantemente bajo condiciones de cultivo microaerofílicas. El complejo de la citocromo bd ubiquinol oxidasa es considerado un heterodímero CydAB (CydA, subunidad I; CydB, subunidad II), con una masa molecular aproximada de 100 kDa¹⁷⁶. Stenberg et al¹⁵⁴ sugieren que YhcB podría ser la tercera subunidad de la citocromo bd ubiquinol oxidasa, formando un complejo con una masa total de 118 kDa que concuerda con la suma de la masa molecular de los tres componentes (58 kDa, 42 kDa y 15 kDa). Sin embargo, en otro estudio¹⁷⁷ se aisló y caracterizó una citocromo bd ubiquinol oxidasa de una cepa mutante $\Delta yhcB$, y observó que la formación de CydAB no depende de la expresión de YhcB. Tras diferentes experimentos, su conclusión fue que YhcB no es indispensable para el ensamblado y función de la citocromo bd ubiquinol oxidasa, sugiriendo que YhcB podría formar parte de algún otro complejo de membrana, o formar complejos homoméricos. En los resultados, CydA es identificada en la 1D hrCNE en una banda con una masa molecular hipotética de 185,98 kDa, y CydA y CydB en la 2D hrCNE/hrCNE en un punto con una masa molecular hipotética de 175,9 kDa. Asimismo, en la 2D hrCNE/SDS-PAGE únicamente identificamos la subunidad CydA (puntos M14, M30 y M31). En la misma vertical se encuentran los puntos M64 y M65, que se corresponden con la hipotética tercera subunidad de la citocromo bd ubiquinol oxidasa. Al contrario que en otros trabajos, los complejos de citocromo bd ubiquinol oxidasa detectados en condiciones nativas, presentan un peso molecular mayor al que le corresponde

¹⁷⁶**Miller MJ, Hermodson M, Gennis RB.** The active form of the cytochrome d terminal oxidase complex of *Escherichia coli* is a heterodimer containing one copy of each of the two subunits. *J Biol Chem.* 1988. 263: 5235-5240.

¹⁷⁷**Mogi T, Mizuochi-Asai E, Endou S, Akimoto S, Nakamura H.** Role of a putative third subunit YhcB on the assembly and function of cytochrome bd-type ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 2006. 1757: 860-864

a los heterodímeros CydAB, o al heterotrímero CydAB-YhcB. Los complejos de la citocromo bd ubiquinol oxidasa, por tanto, podrían ser multímeros formados por diferentes combinaciones de estas tres proteínas, pero es necesario apuntar que la YhcB no fue identificada directamente en los análisis nanoLC-MS/MS, por lo que no podemos asegurar que forme parte o no del complejo junto con la CydA y CydB. Asimismo, a pesar de que no identificamos CydB en la 2D hrCNE/SDS-PAGE, como se indica anteriormente, si detectamos un punto (M43) con una movilidad electroforética de 33 kDa, de forma similar al punto identificado como CydA y localizado en su misma vertical, por lo que parece que ambos puntos podrían formar parte del mismo complejo. Nuestros análisis por espectrometría de masas identifican a este punto como una proteína con homología a una fosfotriesterasa, pero Stenberg et al¹⁵⁴ identifica un punto similar como CydB. A pesar de que la masa molecular estimada para la CydB a partir de su secuencia de DNA y mediante análisis de Ferguson¹⁷⁶ es de 42 kDa, en los geles de SDS-PAGE, CydB muestra una movilidad electroforética de entre 30 y 33 kDa. Todo parece indicar, por tanto, que la CydB que inicialmente no detectamos en nuestro análisis 2D hrCNE/SDS-PAGE se podría corresponder con el punto M43, identificado como fosfotriesterasa. Además, pese a que el análisis MALDI-TOF/TOF solamente evidenció la presencia del CydA, consideramos que el punto M14 podría corresponderse al heterodímero CydAB.

En nuestros resultados también identificamos tres subunidades del complejo de la formato deshidrogenasa (FDH-O), que permite a *E. coli* utilizar el formato como donador de electrones en la respiración aeróbica. Identificamos la subunidad mayor o subunidad α (FdoG) y la subunidad iron-sulfur o subunidad β (FdoH), en la 1D hrCNE y la 2D hrCNE/SDS-PAGE, mientras que la subunidad γ (FdoI) está presente junto a las dos primeras en el punto OG10 de la 2D hrCNE/hrCNE. De ese modo, la hrCNE permitió identificar por primera vez en gel las tres subunidades juntas en una electroforesis nativa. Pan JY et al¹⁵³, utilizando una SDS-PAGE nativa, ha sugerido que la formato deshidrogenasa podría formar un complejo con la formato deshidrogenasa FDH-N, que utiliza formato como donador de electrones en presencia de nitrato durante la respiración anaeróbica. Explican que la formación de este complejo de mayor tamaño permitiría a la bacteria adaptarse rápidamente a cambios ambientales de aerobiosis a

anaerobiosis, y viceversa. También sugieren que la proteína YaeT (BamA/Omp85), interactúa con el complejo de la formato deshidrogenasa, puesto que encuentran a esta proteína en la misma vertical que la FDH-O y FDH-N. Sin embargo, en nuestro estudio no identificamos subunidades de la FDH-N, ni la proteína YaeT, de modo que no podemos confirmar la existencia de dicho complejo. Se cree que la FDH-N se ensambla en trímeros (masa molecular de 510 kDa), con sus monómeros relacionados por medio de un eje de simetría ternaria y forma de champiñón ¹⁷⁸, como puede observarse en la **Figura 52**. En nuestros resultados, la masa molecular estimada del complejo OG10 conteniendo los tres componentes de la FDH-O es de 534,3 kDa, mientras que la masa molecular estimada del complejo D7 detectado en la 1D hrCNE, de 509 kDa, sugiere que podría darse una coincidencia entre ambos.

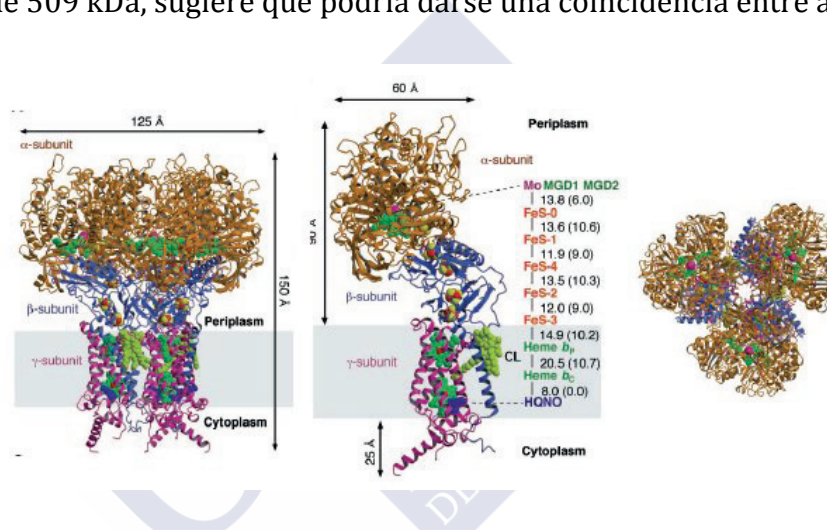


Figura 52. Representación de la Fdh-N (de izq. a der.): visión de un trímero paralelo a la membrana, de un monómero de Fdh-N y de un trímero desde el periplasma. Fuente: Jormakka M et al. *Science*. 2002. 295 (5561): 1863-1868.

El complejo de la succinato deshidrogenasa, también detectado, es un miembro tanto del ciclo de Krebs como de la cadena de transporte de electrones. Se ha descrito como un heterotetrámero (SdhABCD), compuesto por dos componentes hidrofílicos, la flavoproteína (SdhA, 65,08 kDa) y la proteína iron-sulfur (SdhB, 27,37 kDa); y dos subunidades ancladas a membrana e hidrofóbicas, SdhC (14 kDa) y SdhD (15 kDa). En nuestros resultados, se encuentran identificadas SdhA y SdhB, principalmente en los puntos M11 y M45, que se

¹⁷⁸Jormakka M, Törnroth S, Byrne B, Iwata S. Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. *Science*. 2002. 295: 1863-1868.

corresponden con una banda de la 1D hrCNE no identificada y que se localiza por debajo del peso de 440 kDa, lo cual es coherente con la estequiometría previamente descrita para este complejo¹⁷⁹. Es importante indicar que los componentes SdhC y SdhD, debido a su bajo peso molecular, probablemente se perdieron y no pudieron ser detectados en la 2D hrCNE/SDS-PAGE.

Otro complejo de membrana interna detectado en la 2D hrCNE/SDS-PAGE fue el HflKC, formado por las proteínas HflK (45,51 kDa) y HflC (37,63 kDa). Ambas proteínas están asociadas en la membrana interna, y contienen dominios periplásmicos y de membrana. Este complejo HflKC, a su vez, forma un complejo proteico con la proteína FtsH (HflB), y recibe el nombre de HflA. Se ha descrito que FtsH es la proteasa degradadora de cII (regulador de transcripción del bacteriófago λ , que activa la transcripción de genes involucrados en el establecimiento de la lisogenia) y que HflKC es un modulador de la función de FtsH. Aunque la proteína HflC ha sido previamente detectada usando BNE^{180, 181}, en nuestro estudio con hrCNE conseguimos detectar ambos componentes.

Asimismo, en nuestro estudio identificamos varios componentes del complejo de la ATPasa, de gran importancia celular puesto que se encarga de la producción de ATP como resultado del aprovechamiento de un gradiente electroquímico de protones. Este complejo, a su vez, está formado por dos subcomplejos, uno de membrana interna denominado F_0 , constituido por tres tipos de subunidades (α , β y c , con estequiometría ab_2c_{9-12})¹⁸², y que proporciona una vía de paso para los protones a través de la membrana; y otro denominado F_1 , constituido por cinco tipos de subunidades (α , β , γ , δ y ϵ , con estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$), y que contiene el lugar catalítico para la producción de ATP. Nuestros análisis han permitido la identificación de cuatro de estas ocho subunidades (α , β ,

¹⁷⁹Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*. 2003. 299: 700-704.

¹⁸⁰Kihara A, Akiyama Y, Ito K. Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. 94: 5544-5549.

¹⁸¹Bandyopadhyay K, Parua PK, Datta AB, Parrack P. *Escherichia coli* HflK and HflC can individually inhibit the HflB (FtsH)-mediated proteolysis of lambda cII in vitro. *Arch. Biochem. Biophys*. 2010. 501: 239-243. doi: 10.1016/j.abb.2010.06.030.

¹⁸²Weber J, Senior AE. Catalytic mechanism of F1-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 1997. 1319: 19-58.

δ y b), formando una vertical en el mapa proteico de la 2D hrCNE/SDS-PAGE (M18, M19-20, M52 y M59), y por tanto, interaccionando. Las dos subunidades b conectan el subcomplejo F_1 y el F_0 , interactuando con la subunidad δ , que a su vez interactúa con las subunidades α y β . La interacción entre las dos subunidades b y la subunidad δ , que forman la “stator stalk”¹⁸³, obedece a la necesidad de anclar el F_1 y no se produzca una co-rotación entre este y el par rotor (“rotor stalk”) ϵ/γ , que es el encargado de modular el paso coordinado de protones hacia el citoplasma¹⁸⁴. Se puede observar una representación de la estructura completa de una ATPasa en la **Figura 53**. Por otro lado, las cuatro subunidades identificadas mostraron un peso molecular ligeramente superior al predicho, lo cual podría explicarse por una migración menor a causa del estado desnaturalizado de dichas proteínas. Las subunidades b y β , además, se encuentran en otros puntos del mapa proteico de forma independiente, en la misma horizontal que M59 y M19-20, respectivamente, lo cual indica que la combinación de detergentes utilizados preservan en gran medida el complejo, pero no totalmente.

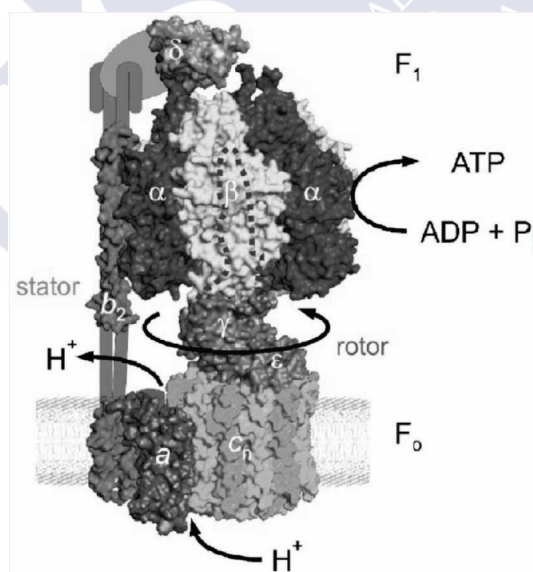


Figura 53. Representación de una ATPasa. Fuente: Weber J. *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1757 (9-10): 1162-1170.

¹⁸³Weber J. ATP synthase: subunit-subunit interactions in the stator stalk. *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1757: 1162-1170.

¹⁸⁴Senior AE. Two ATPases. *J Biol Chem*. 2012. 287: 30049-30062. doi: 10.1074/jbc.X112.402313.

También detectamos componentes de otros sistemas celulares, principalmente bombas de eflujo, como la p-hydroxybenzoic acid¹⁸⁵ y la YajC⁵², así como otros componentes de la membrana interna.

Las proteínas de localización citoplasmática representaron un 27% del total de proteínas detectadas: proteínas involucradas en el metabolismo del RNA, como la tRNA pseudouridina sintetasa; proteínas que realizan almacenaje y transporte de hierro, como la ferritina; proteínas que actúan contra el estrés oxidativo, como la superóxido dismutasa; y proteínas responsables del correcto ensamblado de otras proteínas, como la GroEL. En este último caso, es importante citar la amplia presencia de esta chaperonina, que fue identificada en la 1D hrCNE, la 2D hrCNE/hrCNE y la 2D hrCNE/SDS-PAGE. En los análisis electroforéticos en condiciones nativas, la GroEL apareció asociada tanto a proteínas de membrana interna como externa, a pesar de que en la gran mayoría de trabajos se subraya que la localización de esta chaperona es exclusivamente citosólica. Sin embargo, en nuestros resultados, la GroEL aparece interaccionando con complejos de membrana que no responden a la localización aceptada para esta proteína. Las chaperonas periplásmicas interactúan con las proteínas de membrana externa hasta que estas atraviesan el periplasma, para evitar su agregación en complejos solubles. Por tanto, esta situación genera algunos interrogantes, especialmente el modo en que la GroEL obtiene energía fuera de la membrana interna, o qué sistemas de secreción utiliza para trasladarse de unas localizaciones subcelulares a otras. En relación a la obtención de energía, un estudio reciente sugiere que esta chaperona no necesita ATP para su actividad, cuando está localizada fuera del citoplasma¹⁸⁶.

¹⁸⁵Van Dyk TK, Templeton LJ, Cantera KA, Sharpe PL, Sariaslani FS. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? *J Bacteriol.* 2004. 186: 7196-7204.

¹⁸⁶Leverrier P, Vertommen D, Collet JF. Contribution of proteomics toward solving the fascinating mysteries of the biogenesis of the envelope of *Escherichia coli*. *Proteomics.* 2010. 10: 771-784.

2. COMPLEXOMA DE *SERRATIA MARCESCENS*

El análisis del complexoma de la envuelta celular de *S. marcescens* mediante hrCNE, descrito en este trabajo, es el primer estudio global de proteínas y complejos proteicos de envuelta celular realizado hasta la fecha, lo cual planteó limitaciones en la interpretación de los resultados por ausencia de estudios previos. Como alternativa, se recurrió a los datos derivados de *E. coli*, organismo modelo de bacterias Gram-negativas.

Para llevar a cabo este análisis del complexoma de la envuelta celular de *S. marcescens*, se realizaron análisis equivalentes a los realizados en *E. coli*: un análisis electroforético nativo mediante 1D hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo (**Figura 34**); y dos análisis electroforéticos bidimensionales: una 2D hrCNE/SDS-PAGE, utilizando como detergente iónico el DDM en la 1D (**Figura 36**), y un tratamiento desnaturizante para la 2D, y una 2D hrCNE/hrCNE (**Figura 35**), en la cual los dos detergentes no iónicos más adecuados en la separación de complejos fueron el DDM en la 1D y el TX-100 en la 2D. a pesar de ello, se realizaron ensayos con otros detergentes como la digitonina y el OG, pero ninguno de ellos ofreció una resolución adecuada. Las aclaraciones en relación a la diferente sensibilidad de los complejos proteicos y proteínas frente a los diferentes detergentes no iónicos, y la capacidad de adaptar la hrCNE a los casos específicos ya han sido incluidas previamente en la discusión de los resultados de *E. coli*. Los hipotéticos complejos proteicos de la envuelta celular de *S. marcescens* tratados mediante 2D hrCNE/hrCNE fueron analizados por MALDI-TOF/TOF (**Tabla 7**). Del mismo modo, los componentes de dichos complejos proteicos detectados mediante 2D hrCNE/SDS-PAGE fueron analizados también por MALDI-TOF/TOF, siendo identificados 70 puntos de un total de 92 (**Tabla 8**).

Al igual que en el análisis de *E. coli*, nuestros resultados revelan la presencia de proteínas citoplasmáticas, de membrana externa e interna, y de periplasma, así como proteínas relacionadas con el material genético. Esto se ajusta por tanto a la composición aceptada para las OMVs y envuelta celular de bacterias Gram-negativas^{152, 153, 154, 155, 156}. Además, las familias descritas como más abundantes en las OMVs (complejos de porinas, miembros de sistemas de secreción, bombas de

eflujo, componentes del metabolismo energético y chaperonas), están presentes también en los resultados de *S. marcescens*. La localización subcelular de las proteínas y complejos identificados, así como su función (**Figura 37**), fueron establecidas de acuerdo a las anotaciones de la base de datos UniprotKB, de modo que la existencia de algunas de las proteínas identificadas está simplemente inferida por homología o predicha, pero no establecida a nivel proteína, de ahí la necesidad de que se lleven a cabo más estudios proteómicos sobre esta bacteria dada su mencionada importancia clínica y biotecnológica. Los datos proporcionados por UniprotKB revelaron la presencia de un porcentaje menor de proteínas de membrana externa e interna (28,6%) con respecto a las proteínas citosólicas (53,6%). Sin embargo, es necesario apuntar que, al igual que en el estudio de *E. coli*, aunque en menor porcentaje, la abundancia relativa de las proteínas de membrana externa e interna es mayor. Estudios previos⁴², sugieren que podrían existir algunas proteínas enriquecidas o empobrecidas en las OMV en relación al método de extracción de las mismas. Las divergencias presentes en otros estudios en relación al método de extracción podrían ser un exponente de ello.

En relación a la función desempeñada por las proteínas y complejos identificados (**Figura 37**), un 28% se encuentran dentro de la categoría de enzimas y un 23% participan en el metabolismo energético. Estos porcentajes son casi idénticos a los obtenidos en *E. coli* (26% y 23%, respectivamente), y resulta muy relevante dado que la suma de ambos porcentajes representa más de la mitad del total de proteínas detectadas. Destaca también el 11% de proteínas relacionadas con el material genético, sugiriendo la presencia de DNA y RNA en las OMVs de *S. marcescens*. El resto de proteínas presentan funciones estructurales (14%), de almacenamiento y transporte (11%) y ensamblado (5%). Los resultados de *S. marcescens* también son coherentes con los estudios previos realizados sobre *E. coli*^{1, 5, 151, 152, 153, 154, 155, 156} en los que se describe la abundancia de ciertas familias proteicas: las porinas, los miembros de sistemas de secreción y bombas de eflujo y chaperoninas.

Los datos derivados de nuestros resultados revelan la presencia de porinas y componentes de sistemas de secreción. Entre las porinas, destaca la presencia de

la porina OmpF. En este caso, tampoco está presente la OmpC, pudiendo ser que este tipo de porina no esté presente en el género *Serratia*, en la especie *S. marcescens* o al igual que lo descrito anteriormente en el caso de *E. coli*, que exista una relación directa entre la expresión de ambas porinas. Esta proteína presenta un peso molecular aproximado de 41 kDa, y se encuentra formando homotrímeros. La presencia en el mapa proteico de la 2D SDS-PAGE de un punto de 90 KDa identificado como la porina OmpF podría sugerir la presencia de homodímeros, y que el tratamiento reductor previo a la 2D no fue suficiente para romper su interacción. Esto ya fue comprobado en estudios que involucran a los complejos de porinas de *N. meningitidis*⁷². Asimismo, en la vertical de los mencionados homodímeros de porina OmpF, se identificó una porina de tipo Gram-negativo ("Gram-negative type porin"). La homología de esta porina con la porina OmpF de *S. marcescens* a nivel de secuencia es de un 70%, de modo que sugerimos que este punto podría corresponderse con un monómero de la porina OmpF. Esta porina de tipo Gram-negativo fue identificada también en el mapa proteico de la 2D hrCNE/hrCNE, y a pesar de que los pesos moleculares utilizados en la hrCNE son meramente orientativos, puesto que dependen del peso de la proteína o el complejo proteico, pero también del tamaño de las micelas formadas por los detergentes, el hecho de que se encuentre situada a una altura que podría sugerir la presencia de homotrímeros de OmpF, en coherencia con los datos ofrecidos por UniprotKB.

Es necesario destacar que en *S. marcescens*, igual que en *E. coli*, se encuentra presente la proteína dihidrolipoamida dehidrogenasa (DLDH), que forma parte del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Anteriormente, se planteó la hipótesis de que esta proteína tuviese alguna relación con la porina OmpF, puesto que ambas son identificadas en la misma banda de la 1D hrCNE y ocupan una misma vertical en el mapa proteico de la 2D hrCNE/SDS-PAGE. Esto último ocurre también en el caso de *S. marcescens*, lo cual apoya la hipótesis planteada anteriormente.

Además de la porina OmpF y esta porina de tipo Gram-negativo, hemos detectado la presencia de otra porina común en bacterias Gram-negativas, la porina OmpA, de la que ya se ha hablado en la discusión de *E. coli*^{167, 168, 169, 170, 171, 172}. Aunque en el caso de *E. coli* se detectaron dos puntos de diferentes pesos

moleculares correspondientes a dos estados conformacionales diferentes del monómero, en los resultados de *S. marcescens* sólo identificamos la porina OmpA en un único punto con un peso molecular de 23-24 kDa, de modo que podríamos sugerir que se trata de un fragmento parcial de dicho monómero o que presenta un tamaño inferior al de la OmpA de *E. coli*. No fueron identificados homodímeros de porina OmpA. Finalmente, también detectamos otra porina con homología con un fragmento de la porina OmpN, una porina homotrimérica no específica cuyo gen presenta una alta homología con OmpF, OmpC y PhoE, y que no había sido identificada hasta este estudio a nivel de gel.

Por lo tanto, los complejos de porinas se encuentran muy presentes en *S. marcescens*, igual que ocurre en *E. coli*, compartiendo en este caso las porinas OmpF y OmpA. Asimismo, el porcentaje relativo de proteínas de membrana externa, constituido en gran medida por los complejos de porinas, es muy semejante en ambas bacterias (11,5 % en *E. coli* y 10,7 % en *S. marcescens*).

Otro de los complejos detectados en los resultados es el complejo YaeT (también conocido como complejo Bam) que junto con SecYEG forma un sistema de secreción y biogénesis de envuelta celular en bacterias Gram-negativas¹⁸⁷, y que ha sido ampliamente estudiado en *E. coli*. El complejo YaeT está formado por varios componentes. El principal componente es el YaeT, también BamA (punto 15), una proteína integral de membrana con un dominio periplasmático, y otros cuatro componentes auxiliares: YfgL (BamB), NlpB (BamC), YfiO (BamD) y SmpA (BamE), que completan la estructura, que a su vez se divide en dos sub-complejos (YaeT-YfgL, y NlpB-YfiO-SmpA)¹⁸⁸. La disposición de las subunidades puede observarse en la **Figura 54**. En nuestros resultados, se detectan los componentes del subcomplejo YaeT-YfgL. Los cuatro componentes auxiliares del complejo se asocian a YaeT a través de unos dominios periplasmáticos denominados POTRA ("Polypeptide transport-associated domains"), uniéndose cada componente a uno de los dominios. Hasta ahora, la existencia de estos componentes había sido

¹⁸⁷Kim S, Malinverni JC, Sliz P, Silhavy TJ, Harrison SC, Kahne D. Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science*. 2007. 317: 961-964.

¹⁸⁸Ricci DP, Hagan CL, Kahne D, Silhavy TJ. Activation of the *Escherichia coli* β -barrel assembly machine (Bam) is required for essential components to interact properly with substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. 109: 3487-3491.

simplemente inferida por homología en *S. marcescens*. La ausencia de los componentes del sub-complejo NlpB-YfiO-SmpA podría deberse a que la combinación y concentración de los detergentes utilizados en nuestro análisis da lugar a alteraciones en este sub-complejo pero no en el sub-complejo YaeT-YfgL. En consecuencia, es posible que ambos presenten una sensibilidad diferente al tratamiento empleado. En la 2D hrCNE/hrCNE, el complejo es detectado con una movilidad electroforética de 250 kDa, si bien se corresponde en la 1D hrCNE (DDM) con una banda de 220-230 kDa de movilidad electroforética. Aunque, como se ha explicado anteriormente, el cálculo de los pesos moleculares de los complejos en la hrCNE no es completamente fiable, nuestra experiencia nos permite afirmar que es bastante orientativo si el detergente elegido es el DDM. Puesto que la suma de los pesos moleculares de YaeT y YfgL es de 130 kDa, podríamos explicar esa movilidad electroforética de los 220-230 kDa si en el complejo detectado se encontrasen presentes también los componentes del sub-complejo NlpB-YfiO-SmpA, que en conjunto suman unos 210 kDa.

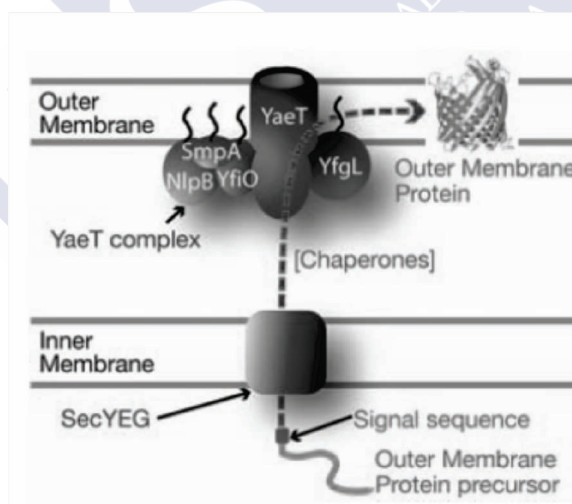


Figura 54. Representación del sistema de biogénesis formado por el complejo YaeT y el SecYEG.
Fuente: Kim S et al. *Science*. 2007. 317 (5840): 961-964.

En nuestros resultados también detectamos bombas de eflujo, componentes de membrana que juegan un papel crucial en la supervivencia de la bacteria en su

resistencia frente a la acción de antibióticos¹⁸⁹. La principal bomba de eflujo detectada es la SdeXY, una importante bomba de eflujo del tipo RND (“Resistance-nodulation-cell division superfamily”)¹²⁶, que destaca precisamente por aportar a la bacteria resistencia frente a un amplio grupo de sustancias, entre ellas antibióticos (eritromicina, tetraciclina, cloruro de benzalconio, norfloxacin, acriflavina, bromuro de etidio, rodamina, tigeciclina¹⁹⁰). Los dos componentes de esta bomba de eflujo, SdeX y SdeY, son detectados en los puntos 68 y 17, respectivamente, aunque no dibujando una misma vertical. El componente SdeY es una proteína integral de membrana interna, mientras que SdeX es fundamentalmente periplasmática, aunque está anclada a la membrana interna y funciona como proteína adaptadora entre SdeY y el componente correspondiente de la membrana externa, HasF. A pesar de que SdeXY ha sido muy poco estudiada, sus componentes presentan una elevada homología con el bien conocido sistema AcrAB-TolC, de *E. coli*¹⁹¹. Las semejanzas de secuencia sugieren que el complejo SdeXY podría tener una estructura y disposición similares a AcrAB en las membranas de *S. marcescens*. El componente SdeX, similar a AcrA en *E. coli*, interactúa con HasF y SdeY. El hecho de que no la encontremos en la vertical bajo la SdeY podría deberse a un efecto de la combinación de los detergentes no iónicos utilizados en la separación electroforética. La migración diferencial de los componentes en la 1D podría provocar que estos no aparezcan en la misma vertical en el mapa proteico de la 2D. Sin embargo, en nuestros resultados también identificamos un componente de bomba de eflujo (punto 76) en la vertical del SdeY (punto 17). Aunque este punto no está identificado específicamente como SdeX, su secuencia aminoacídica presenta una homología del 99% con componente de bomba de eflujo de tipo RND y un 94% de homología con SdeX, lo cual sugiere que de hecho este punto podría ser SdeX. Es destacable que, si bien no hubo coincidencias entre las bombas de eflujo y sistemas de secreción detectados en

¹⁸⁹**Page MG.** The role of the outer membrane of Gram-negative bacteria in antibiotic resistance: Ajax's shield or Achilles' heel? *Handb Exp Pharmacol.* 2012. 211: 67-86. doi: 10.1007/978-3-642-28951-4_5.

¹⁹⁰**Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Hudson S, Livermore DM, Woodford N.** Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and ceftiofime. *J Antimicrob Chemother.* 2010. 65: 479-482.

¹⁹¹**Symmons MF, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V.** The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. 106: 7173-7178.

S. marcescens con respecto a las detectadas en *E. coli*, en esta última fue detectado el componente de membrana externa TolC, pero no los componentes correspondientes de membrana interna AcrAB. Paradójicamente, en *S. marcescens*, como ya se ha comentado, observamos la situación opuesta, detectando los componentes de membrana interna equivalentes a AcrAB, SdeXY, pero no el componente de membrana externo equivalente a TolC, HasF.

Asimismo, también detectamos una proteína involucrada en la síntesis de glucanos osmorregulados ("Glucan biosynthesis protein G"), y un dominio proteico del flagelo, algo coherente con la movilidad flagelar descrita para *S. marcescens*.

Una de las familias proteicas más representadas en las OMV de bacterias Gram-negativas, las chaperonas, están presentes también en los resultados de OMV de *S. marcescens*, de igual modo que en los de *E. coli*. La subunidad GroEL del complejo de esta chaperona fue identificada positivamente tras la 2D hrCNE/hrCNE (su movilidad electroforética fue la idéntica utilizando DDM o TX-100 en el tampón de cátodo, un comportamiento similar al de otras chaperoninas analizadas, como las de *N. meningitidis*)⁷². El otro componente de este complejo, el GroES, no apareció en nuestros análisis. Esto no es inesperado puesto que su peso molecular (sobre 11 kDa) no entra en el rango correspondiente al gradiente de poliacrilamida de los geles utilizados. Emplear diferentes gradientes de poliacrilamida es una estrategia que podría facilitar la detección de componentes minoritarios en determinados complejos proteicos, tanto en *S. marcescens* como en *E. coli* y otras bacterias. Además de la GroEL, también se observó la presencia de la chaperona celular DnaK, una importante chaperona presente en numerosas bacterias Gram-negativas, y que además de su actividad chaperona participa en la replicación del cromosoma bacteriano y del fago Lambda¹⁹². Tanto GroL como DnaK forman parte de la familia HSP ("Heat Shock Proteins"), chaperonas que desempeñan su función en condiciones de estrés, con el objetivo de mantener la viabilidad de las proteínas celulares. Los resultados obtenidos a partir de la 2D hrCNE/SDS-PAGE también muestran la presencia de la subunidad C/D de la PpiC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, que presenta actividad rotamasa,

¹⁹²Zylicz M, Ang D, Liberek K, Georgopoulos C. Initiation of lambda DNA replication with purified host- and bacteriophage- encoded proteins: the role of the dnaK, dnaJ and grpE heat shock proteins. *EMBO J.*1989. 8: 1601-1608.

acelerando el ensamblado correcto de proteínas al catalizar la isomerización cis-trans en oligopéptidos¹⁹³.

Nuestros resultados revelan una abundante presencia de complejos proteicos y proteínas involucradas en la maquinaria de producción energética de la célula, especialmente miembros de la cadena de transporte de electrones, lo cual es consistente con otros estudios proteómicos de envuelta celular de bacterias Gram-negativas^{152, 153, 154, 155, 156, 194}, y con los resultados previos de *E. coli*. Así, están presentes dos de los componentes de la ATPasa (la subunidad α y β), en la misma vertical y por tanto formando un complejo. Estos componentes también fueron observados de forma independiente en otros puntos del mapa proteico 2D hrCNE/SDS-PAGE, probablemente disociados del complejo. La ATPasa se encuentra asociada a la cadena de transporte de electrones, pero también se encuentra de forma individual en otros puntos de la membrana participando en procesos metabólicos que requieren de energía en forma de ATP. El complejo de la ATPasa, como se ha indicado anteriormente, está formada por dos subcomplejos, el F_0 y el F_1 . Mientras que en *E. coli* detectamos cuatro de estos componentes (α , β y δ , del subcomplejo F_0 , y b del subcomplejo F_1), en *S. marcescens* solamente se detectan dos de ellos, α y β . Ambas forman parte de la “stator stalk”, constituyendo el núcleo catalítico en donde se produce la formación de ATP. En la **Figura 53** puede observarse más claramente la estructura de la ATPasa. Dado que el tratamiento de la muestra es idéntico en ambas bacterias, habría que estudiar en profundidad la causa de que se detecten menos componentes de la ATPasa en el caso de *S. marcescens*.

Como se ha indicado previamente, modificando la combinación de detergentes no iónicos utilizados, así como su concentración, podrían detectarse estas interacciones de diferente sensibilidad. Otros componentes de la cadena de transporte de electrones presentes (tanto en el mapa proteico de la 2D hrCNE/hrCNE como en el de la 2D hrCNE/SDS-PAGE) son las subunidades I y II de

¹⁹³Reffuveille F, Connil N, Sanguinetti M, Posteraro B, Chevalier S, Auffray Y, Rince A. Involvement of peptidylprolyl cis/trans isomerases in *Enterococcus faecalis* virulence. *Infect Immun*. 2012. 80: 1728–1735.

¹⁹⁴Maddalo G, Chovanec P, Stenberg-Bruzell F, Nielsen HV, Jensen-Seaman MI, Ilag LL, Kline KA, Daley DO. A reference map of the membrane proteome of *Enterococcus faecalis*. *Proteomics*. 2011. 11: 3935-3941.

la citocromo oxidasa. La subunidad III no fue observada probablemente debido a que presenta un peso molecular demasiado bajo para el gradiente utilizado, como ocurre con el componente GroES de la chaperona GroL, del que se ha hablado anteriormente. Al igual que en *E. coli* se detecta la presencia de otras proteínas de la cadena de transporte de electrones como un grupo de deshidrogenasas: succinato deshidrogenasa, formato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, NADH:ubiquinona oxidoreductasa, así como la quinoprotein glucosa deshidrogenasa, que además de participar en el metabolismo energético de la célula, juega un papel en la inhibición de la producción de prodigiosina¹⁹⁵.

Aparece también una amplia variedad de componentes de complejos y proteínas relacionadas con diferentes procesos celulares, principalmente con el metabolismo de carbohidratos, pero también con la degradación de aminoácidos y péptidos, la síntesis de ácidos nucleicos, etc. Finalmente, como se ha indicado al principio de la discusión, se detectó un 11% de proteínas relacionadas con el procesamiento del material genético (degradación mRNA, síntesis de tRNA y proteínas, etc), lo cual es una prueba más de que, al igual que en las OMVs de *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas, las OMVs de *S. marcescens* también contienen DNA y RNA.

En *E. coli*, un organismo ampliamente estudiado, la diversidad de condiciones de cultivo, métodos de extracción, técnicas electroforéticas y espectrométricas utilizadas, etc, dificultaban en cierto modo la comparación de resultados, en *S. marcescens*, al carecer de estudios globales de envuelta celular, el análisis de los resultados implica utilizar datos de otras bacterias, principalmente *E. coli*. La realización de estudios adicionales ampliaría la información sobre el proteoma de este patógeno oportunista emergente.

¹⁹⁵Fender JE, Bender CM, Stella NA, Lahr RM, Kalivoda EJ, Shanks RM. *Serratia marcescens* quinoprotein glucose dehydrogenase activity mediates medium acidification and inhibition of prodigiosin production by glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. 78: 6225-6235.

3. “CROSS-LINKING”

El análisis proteómico asociado a tratamientos de “cross-linking” se llevó a cabo con las OMVs de las tres bacterias Gram-negativas introducidas en el apartado 3 de la **Introducción**: *N. meningitidis*, *E. coli* y *S. marcescens*. Para ello, se sometieron las OMVs a un tratamiento con agentes de “cross-linking” químico, y posteriormente se analizaron con técnicas electroforéticas nativas (hrCNE) y desnaturalizantes (SDS-PAGE), así como con la técnica analítica “Western blotting”. Los dos agentes de “cross-linking” químico elegidos fueron los introducidos previamente: el formaldehído y el Sulfo-SBED. Los principales objetivos de este análisis combinado fueron la detección de componentes minoritarios de complejos proteicos que no hubiesen sido detectados en los análisis anteriores, y la puesta a punto de un protocolo específico que combinase el tratamiento de las OMVs con agentes de “cross-linking” y la hrCNE. Esta última, como ya se ha indicado, preserva en la medida de lo posible la estabilidad de los complejos proteicos, mientras que los agentes de “cross-linking” ya han sido utilizados extensivamente en diversos estudios de caracterización de interacciones proteicas, tanto entre proteínas como entre proteínas y material genético, por ejemplo en el estudio del modo en que interaccionan las proteínas de la cromatina con el DNA¹⁹⁶. Además, con frecuencia el cross-linking ha sido asociado a técnicas electroforéticas, cromatográficas y/o espectrométricas^{95, 197, 198, 199, 200}.

El primero de los agentes de “cross-linking” utilizados fue el formaldehído, uno de los agentes clásicos y más empleados. Su eficacia ha sido demostrada en el

¹⁹⁶**Orlando V.** Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci.* 2000. 25: 99-104.

¹⁹⁷**Kim KM, Yi EC, Kim Y.** Mapping protein receptor-ligand interactions via in vivo chemical crosslinking, affinity purification, and differential mass spectrometry. *Methods.* 2012. 56: 161-165. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.10.013.

¹⁹⁸**Auclair JR, Somasundaran M, Green KM, Evans JE, Schiffer CA, Ringe D, Petsko GA, Agar JN.** Mass spectrometry tolos for analysis of intermolecular interactions. *Methods Mol Biol.* 2012. 896: 387-398. doi: 10.1007/978-1-4614-3704-8_26.

¹⁹⁹**Müller MQ, Sinz A.** Chemical cross-linking and high-resolution mass spectrometry to study protein-drug interactions. *Methods Mol Biol.* 2012. 803: 205-218. doi: 10.1007/978-1-61779-364-6_14.

²⁰⁰**Kluger R, Alagic A.** Chemical cross-linking and protein-protein interactions –a review with illustrative protocols. *Bioorg Chem.* 2004. 32: 451-472.

estudio y análisis de interacciones proteicas^{201, 202, 203} y de interacciones entre material genético, frecuentemente DNA, y proteínas^{204, 205, 206, 207, 208}. En el caso de este trabajo, el tratamiento de las OMVs de *N. meningitidis* con formaldehído respondía al objetivo general de este apartado experimental. En trabajos anteriores, el “cross-linking” con formaldehído fue realizado sobre proteínas de *N. meningitidis* en la caracterización de determinados complejos proteicos²⁰⁹, previamente a su análisis por SDS-PAGE. Sin embargo, no hay ningún trabajo previo en el que se utilice en combinación con la hrCNE.

Siguiendo el protocolo indicado en la sección correspondiente de **Material y Métodos**, tras tratar las OMVs con formaldehído, se realizó una 1D hrCNE utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo, cuyo perfil electroforético se muestra en la **Figura 38**. Se puede observar una clara diferencia entre el perfil de OMVs tratadas con formaldehído y el perfil obtenido con las no tratadas. El tratamiento con formaldehído da lugar a una clara pérdida de resolución y nitidez, así como a la pérdida de al menos nueve bandas con respecto al control sin tratamiento. Asimismo, las bandas presentes en el perfil tratado con formaldehído presentaron un engrosamiento y mayor ruido de fondo. Los resultados sugieren que se produce una interacción negativa entre el formaldehído y alguno de los componentes utilizados en la hrCNE. Puesto que este efecto negativo no se ha descrito cuando la muestra tratada con formaldehído es

²⁰¹Vasilescu J, Guo X, Kast J. Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics*. 2004. 4: 3845-3854.

²⁰²Ross DE, Ruebush SS, Brantley SL, Hartshorne RS, Clarke TA, Richardson DJ, Tien M. Characterization of protein-protein interactions involved in iron reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol*. 2007. 73: 5797-5808.

²⁰³Cadieux N, Kadner RJ. Site-directed disulfide bonding reveals an interaction site between energy-coupling protein TonB and BtuB, the outer membrane cobalamin transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96: 10673-10674.

²⁰⁴Merk O, Reiser K, Speit G. Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutat Res*. 2000. 471: 71-80.

²⁰⁵Toth J, Biggin MD. The specificity of protein-DNA crosslinking by formaldehyde: in vitro and in drosophila embryos. *Nucleic Acids Res*. 2000. 28: e4.

²⁰⁶Kaufman BA, Newman SM, Hallberg RL, Slaughter CA, Perlman PS, Butow RA. In organello formaldehyde crosslinking of proteins to mtDNA: identification of bifunctional protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 97: 7772-7777.

²⁰⁷Kurdistani SK, Grunstein M. In vivo protein-protein and protein-DNA crosslink for genomewide binding microarray. *Methods*. 2003. 31: 90-95.

²⁰⁸Perez-Romero P, Imperiale MJ. Assaying protein-DNA interactions in vivo and in vitro using chromatin immunoprecipitation and electrophoretic mobility shift assays. *Methods Mol Med*. 2007. 131: 123-139.

²⁰⁹Sánchez S, Abel A, Arenas J, Criado MT, Ferreirós CM. Cross-linking analysis of antigenic outer membrane protein complexes of *Neisseria meningitidis*. *Res Microbiol*. 2006. 157: 136-142.

analizada en SDS-PAGE²⁰⁹, la sospecha debería dirigirse hacia los detergentes utilizados, tanto los iónicos (DOC) como los no iónicos (DDM, TX-100). A pesar de dicha interacción, se realizaron otros dos análisis electroforéticos, en este caso bidimensionales. En la 2D hrCNE/SDS-PAGE (**Figura 39**), la distorsión de la 1D se traslada a la 2D, dificultando su análisis, que en cualquier caso, no reveló la presencia de componentes no detectados previamente. Por el contrario, se observó la pérdida de los puntos correspondientes a la MSP63 (1*), GroEL (2*) y la MIP (3*), sí presentes en el mapa proteico de OMVs sin tratamiento con formaldehído. En el análisis electroforético bidimensional 2D hrCNE/hrCNE (**Figura 40 y 41**), utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo de la 1D, y TX-100 en el tampón de cátodo de la 2D, la distorsión que se produjo fue aún mayor, y el análisis del mapa proteico prácticamente imposible. La comparación con una 2D hrCNE/hrCNE de OMVs no tratadas (**Figura 41**), es un claro indicador de la pérdida de resolución al emplear el formaldehído en el tratamiento de la muestra.

Tras el análisis y evaluación de los resultados obtenidos con *N. meningitidis*, se decidió descartar el formaldehído como agente de “cross-linking” compatible con la técnica hrCNE.

El segundo agente de “cross-linking” utilizado fue el Sulfo-SBED, un agente heterobifuncional de reciente desarrollo, y que ha sido empleado con éxito en estudios de interacción proteica: aislamiento de los diferentes anticuerpos que se unen a un determinado receptor celular²¹⁰, búsqueda de lugares específicos de interacción^{211,212,213,214,215,216}, e incluso como método de comprobación de

²¹⁰**Chang C, Takayanagi A, Yoshida T, Shimizu N.** Screening of scFv-displaying phages recognizing distinct extracellular domains of EGF receptor by target-guided proximity labeling method. *J Immunol Methods*. 2011. 372: 127-136.

²¹¹**Rao G, Santhoshkumar P, Sharma KK.** Anti-chaperone betaA3/A1 (102-117) peptide interacting sites in human alphaB-crystallin. *Mol Vis*. 2008. 26: 666-674.

²¹²**Udupa EG, Sharma KK.** Effect of oxidized betaB3-crystallin peptide on lens betaL-crystallin interaction with betaB2-crystallin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005. 46: 2514-2521.

²¹³**Hurst GB, Lankford TK, Kennel SJ.** Mass spectrometric detection of affinity purified crosslinked peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2004. 15: 832-839.

²¹⁴**Santhoshkumar P, Sharma KK.** Identification of a región in alcohol dehydrogenase that binds to alpha-crystallin during chaperone action. *Biochim Biophys Acta*. 2002. 1598: 115-121.

resultados obtenidos mediante otras técnicas experimentales²¹⁷. En todos los trabajos realizados hasta la fecha, el Sulfo-SBED ha sido utilizado en mezclas relativamente simples de proteínas. Sin embargo, la estrategia experimental planteada en este estudio es novedosa con respecto a trabajos anteriores, puesto que combina la reacción de “cross-linking” con Sulfo-SBED y la hrCNE, sobre una mezcla compleja de proteínas, las OMVs de *N. meningitidis*, *E. coli* y *S. marcescens*. Mientras que en otros trabajos realizados con Sulfo-SBED la estrategia implicaba el conocimiento de la proteína a la que se une el agente en primer lugar, en el caso de las OMVs, la diana del agente de “cross-linking” puede ser cualquiera de las proteínas presentes en las mismas. Los objetivos, como en el caso anterior, fueron acoplar el “cross-linking” con Sulfo-SBED y la hrCNE, y además lograr la estabilización de interacciones débiles presentes en los complejos proteicos de las OMVs, e identificar componentes minoritarios que previamente no hubiesen sido detectados, aprovechando las ventajas aportadas por la naturaleza estructural y funcional del Sulfo-SBED: mayor amplitud del brazo espaciador, capacidad para decidir en qué momento ocurre la reacción de “cross-linking” gracias al extremo fotoactivable, y la presencia de la molécula de biotina, que permite hacer un seguimiento de la molécula de Sulfo-SBED en “Western-blotting”.

Tras la puesta a punto del protocolo, que se realizó con las proteínas recombinantes RmpM y PorB de *N. meningitidis*, y cuya interacción ya había sido comprobada previamente¹⁴⁸, las OMVs de *N. meningitidis* fueron tratadas con Sulfo-SBED y analizadas mediante hrCNE, utilizando DDM como detergente no iónico en el tampón de cátodo (algo común en todos los resultados referidos al “cross-linking” con Sulfo-SBED). Como se puede observar en la **Figura 44**, en principio el perfil proteico de las OMVs tratadas con respecto a las no tratadas no mostró diferencias significativas. Sin embargo, en los casos de *E. coli* y *S. marcescens*, y especialmente en el caso de la primera, la resolución obtenida en los perfiles resultó inferior a la obtenida habitualmente mediante hrCNE, y se

²¹⁵Kovacic L, Sribar J, Krizaj I. A new photoprobe for studying biological activities of secreted phospholipases A2. *Bioorg Chem*. 2007. 35: 295-305.

²¹⁶Gupta N, Manevich Y, Kazi AS, Tao JQ, Fisher AB, Bates SR. Identification and characterization of p63 (CKAP4/ERGIC-63/CLIMP-6), a surfactant protein A binding protein, on type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006. 291: L436-446.

²¹⁷Ling S, Cheng A, Pumpens P, Michalak M, Holoshitz J. Identification of the rheumatoid arthritis shared epitope binding site on calreticulin. *PLoS One*. 2010. 5: e11703.

observaron diferencias en el patrón de bandas, especialmente en *E. coli*. Estas diferencias podrían deberse a algún tipo de interacción entre el Sulfo-SBED y la hrCNE, o bien a que el agente está estabilizando componentes de complejos proteicos que la técnica electroforética previamente no preservaba, lo cual podría estar detrás de dichos cambios. En todo caso, se observa cierta pérdida de resolución con respecto a los perfiles proteicos habituales de la hrCNE.

El subsiguiente análisis realizado fue un análisis electroforético comparativo con OMVs tratadas con Sulfo-SBED, fotoactivadas y no fotoactivadas. Los perfiles electroforéticos obtenidos mediante 1D hrCNE (**Figuras 46, 47 y 48**) no mostraron apenas diferencias entre ambos tipos de muestra en ninguna de las tres bacterias, lo cual no resulta inesperado. Puesto que la hrCNE ya preserva de por sí la interacción de los componentes de los complejos proteicos, las diferencias se esperarían en el análisis bidimensional, realizado de acuerdo al esquema indicado en la **Figura 45**. El resultado para cada tipo bacteriano de este análisis por 2D hrCNE/SDS-PAGE y su posterior “Western-blotting” correspondiente, para cada bacteria, se muestra en las **Figuras 49, 50 y 51**, tanto para la muestra fotoactivada (cuyo tratamiento previo a la 2D incluyó la presencia de un agente reductor, el β -mercaptoetanol) como para la muestra no fotoactivada (cuyo tratamiento no incluyó ningún agente reductor). Esta estrategia experimental es la que permitiría observar, teóricamente gracias a la biotina acoplada, diferentes señales en las membranas de PVDF que identificasen los componentes de complejos proteicos. Sin embargo, el análisis de los resultados obtenidos resultó menos efectivo de lo previsto. Se observó una reducción significativa del contenido proteico en la 2D, tanto para la muestra fotoactivada como para la no fotoactivada. La hipótesis más factible para explicar esta pérdida de contenido proteico es que el tratamiento de la muestra previo a la 2D no fue suficientemente reductor para provocar la disociación de los complejos, y que parte de ellos no pasaron al gel de la 2D. En el caso de la muestra no fotoactivada, la ausencia del agente reductor sería la causa de esta menor disociación de los complejos proteicos, mientras que en el caso concreto de la muestra fotoactivada, la reducción del contenido proteico podría atribuirse al efecto estabilizador del Sulfo-SBED. Para superar esta importante limitación, sería necesario realizar modificaciones en el tratamiento previo de la muestra antes de la 2D, y hallar las condiciones más adecuadas para

facilitar la detección de los componentes minoritarios que fueron estabilizados en la 1D. Sin tener en cuenta esta problemática, el análisis de los resultados no fue especialmente revelador. En el caso concreto de *N. meningitidis*, cuyo mapa proteico es considerablemente menos diverso que el de *E. coli* y *S. marcescens*, especialmente en número de puntos, no se observaron diferencias entre las muestras fotoactivada y no fotoactivada, aunque la problemática descrita previamente resta significancia al análisis. Aceptando la posibilidad de que parte de la muestra no haya entrado en el gel de la 2D por problemas en el tratamiento previo, podría ocurrir además que, como se comenta anteriormente, el agente de “cross-linking” estuviese realmente estabilizando componentes de complejos proteicos y que luego estos no se transfiriesen a la segunda dimensión, y por tanto, no fuesen detectados. En el caso de *E. coli* y *S. marcescens*, además, se observó un efecto en las membranas de PVDF similar al que se produce cuando queda aire atrapado durante el montaje del “Western-blot”, lo cual dificultó aún más su análisis. Este efecto fue especialmente patente en *E. coli*, y menor en *S. marcescens*. Dado que el proceso experimental fue exactamente igual para las tres bacterias utilizadas, que se realizaron numerosas réplicas asegurando minuciosamente el contacto entre gel y membrana, y que dicho efecto no se presentó en *N. meningitidis*, no encontramos una explicación satisfactoria para establecer la causa del mismo.

Aunque no observamos diferencias significativas entre los geles correspondientes a las muestras fotoactivadas y no fotoactivadas, en el caso de los “Western-blots” se aprecia una notable pérdida de señal cuando la muestra es fotoactivada. Esto es lógico teniendo en cuenta que las muestras no fotoactivadas mantienen todas las moléculas de “cross-linking” con la biotina asociada, al no haberse incluido el tratamiento con el β -mercaptoetanol, mientras que en el caso de las muestras fotoactivadas, tratadas con el agente reductor, la biotina se pierde cuando no consigue unirse a una segunda proteína.

Al comparar las imágenes de los “Western-blots” de las muestras fotoactivada y no fotoactivada, en el caso de *E. coli*, no detectamos un intercambio de la señal de biotina entre posibles componentes de un mismo complejo. Esto podría tener diferentes explicaciones. Así, una de ellas podría ser la presencia

mayoritaria de homocomplejos, es decir, complejos proteicos formados por varias copias de la misma proteína, de modo que aunque el agente de “cross-linking” esté funcionando, la señal de biotina permanece siempre en el mismo tipo de proteína, y por lo tanto es detectada en el mismo punto en ambos “Western-blot”. Otra posibilidad es que la molécula de biotina esté siendo transferida a un componente cuyo peso molecular sea demasiado pequeño como para ser detectado con el gradiente utilizado en el gel de la 2D. En este caso concreto, del mismo modo que se ha apuntado en las discusiones anteriores, utilizar diferentes gradientes permitiría ampliar el rango de detección de la técnica, y podría ser útil en la detección de determinados componentes. También cabe la posibilidad de que se esté produciendo un intercambio de señal entre componentes de un mismo complejo. Finalmente, el hecho de que los perfiles proteómicos obtenidos cuando tratamos las OMVs con Sulfo-SBED difieran notablemente de los obtenidos con OMVs sin tratar, sugiere una vez más que el tratamiento desnaturalizante no es el adecuado, lo que implicaría que en muchos casos los complejos, al presentar un peso molecular superior a los 100-120 kDa, no penetran en el gel durante la segunda dimensión. Evidentemente, esto imposibilitaría la detección de los componentes de dichos complejos, y especialmente, de los componentes minoritarios, objeto principal de este análisis.

A pesar de todo, en el caso de *S. marcescens*, detectamos un posible traslado de la molécula de biotina entre dos proteínas situadas en la misma vertical (ver **Figura 51**), si bien no hemos podido identificar los puntos correspondientes en los geles de poliacrilamida y el intento de identificación a partir de la membrana de PVDF fue infructuoso. No descartamos que pueda ocurrir lo mismo con algún complejo en *E. coli*, si bien el efecto comentado anteriormente en las membranas, así como el ruido de fondo, nos han impedido realizar cualquier tipo de análisis comparativo.

Finalmente, y a pesar de la efectividad del Sulfo-SBED en la detección de los componentes RmpM y PorB de *N. meningitidis*, así como en los estudios referidos en la bibliografía, en el caso concreto del análisis de las OMVs, las limitaciones del protocolo han impedido la detección de componentes minoritarios de complejos proteicos. Este protocolo debe seguir siendo adaptado para que la combinación de

estas técnicas sea resolutive, en especial el tratamiento previo a la 2D, toda vez que los componentes de la hrCNE parecen ser compatibles con la reacción de “cross-linking” con Sulfo-SBED, al contrario de lo que ocurría con el formaldehído. Asimismo, mejorar los sistemas de análisis espectrométrico habilitados para la identificación a partir de membranas de PVDF sería de gran utilidad en estos casos.





CONCLUSIONES

- I. Las técnicas electroforéticas 1D hrCNE, 2D hrCNE/hrCNE y 2D hrCNE/SDS-PAGE han demostrado un gran potencial en la separación y caracterización de complejos proteicos de la envuelta celular de Gram-negativas, muchos de los cuales son complejos de membrana.
- II. La electroforesis 2D hrCNE/hrCNE, además de permitir la resolución de complejos comigrantes en la primera dimensión ha permitido evidenciar que los principales complejos de la envuelta celular de bacterias Gram-negativas cuya movilidad electroforética se ve afectada por el detergente no iónico elegido, son aquellos correspondientes a los de las porinas, citocromo bd ubiquinol oxidasa y ferritina. Por otra parte, las diferencias observadas entre los resultados de *E. coli* y *S. marcescens* hacen patente la necesidad de optimizar la técnica en cada caso, poniendo especial atención a la elección de los detergentes.
- III. La hrCNE ha demostrado una eficacia equivalente a la BNE en el estudio del complexoma de bacterias Gram-negativas, pero con la ventaja añadida de ser una técnica que no interfiere con análisis fluorimétricos y catalíticos, lo que la convierte en una técnica muy útil por ejemplo en estudios comparativos de expresión proteica.
- IV. Tanto en *E. coli* como en *S. marcescens* nuestros análisis han confirmado la presencia en las OMVs de proteínas citoplasmáticas, de membrana externa e interna, de periplasma y de proteínas relacionadas con el material genético.
- V. El análisis proteómico del complexoma de la envuelta celular de *E. coli* ha permitido por primera vez detectar los dos componentes del complejo HflCK juntos en el mismo análisis; una posible nueva interacción entre la porina OmpF y la proteína DLDH (también observada en el análisis de *S. marcescens*); y la presencia de monómeros plegados y no plegados de la porina OmpA independientemente del tratamiento con o sin calor.

- VI. El agente de “cross-linking” heterobifuncional Sulfo-SBED, en combinación con la hrCNE y otras técnicas analíticas, podría ser una herramienta útil en la detección e identificación de complejos proteicos y de sus componentes, especialmente de aquellos minoritarios o con interacciones débiles.
- VII. Finalmente, consideramos que debido a la gran variabilidad de parámetros de cultivo, preparación de muestra y técnicas de análisis utilizadas, es necesario establecer cierta estandarización en estudios metabólicos y de expresión similares. Sin embargo, también creemos que la integración de los datos obtenidos mediante el uso de diferentes estrategias para el análisis proteómico de un microorganismo determinado, puede favorecer un mayor conocimiento de su proteoma y complexoma.



BIBLIOGRAFÍA

- Abian J.** *J Mass Spectrom.* 1999. 34: 157-168.
- Aizawa SI.** *Desk Enciclopedia of Microbiology.* 2004. USA. Elsevier Academic Press.
- Alvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, Hill C.** *Microbiology.* 2011. 157: 3268-3281.
- Andrä J, de Cock H, Garidel P, Howe J, Brandenburg K.** *Med Chem.* 2005. 1: 537-546.
- Arié JP, Miot M, Sassoon N, Betton JM.** *Mol Microbiol.* 2006. 62: 427-437.
- Auclair JR, Somasundaran M, Green KM, Evans JE, Schiffer CA, Ringe D, Petsko GA, Agar JN.** *Methods Mol Biol.* 2012. 896: 387-398. doi: 10.1007/978-1-4614-3704-8_26.
- Back JW, de Jong L, Muijsers AO, de Koster CG.** *J Mol Biol.* 2003. 331: 303-313.
- Bakkiyaraj D, Sivasankar C, Pandian SK.** *Bioorg Med Chem Lett.* 2012. 22: 3089-3094.
- Bandyopadhyay K, Parua PK, Datta AB, Parrack P.** *Arch. Biochem. Biophys.* 2010. 501: 239-243. doi: 10.1016/j.abb.2010.06.030.
- Barchiesi J, Castelli ME, Di Venanzio G, Colombo MI, García Vescovi E.** *J Bacteriol.* 2012. 194: 2949-2961.
- Barrier M, Mirkes PE.** *Reprod Toxicol.* 2005. 19: 291-304.
- Baslé A, Rummel G, Storici P, Rosenbusch JP, Schirmer T.** *J Mol Biol.* 2006. 362: 933-942.
- Bay DC, Rommens KL, Turner RJ.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 2008. 1778: 1814-1838.
- Beddek AJ, Li MS, Kroll JS, Jordan TW, Martin DR.** *Infect Immun.* 2009. 77: 2989-2994.
- Berggård T, Linse S, James P.** *Proteomics.* 2007. 7: 2833-2842.
- Billker O, Gödert S, Meyer TF.** *Emerging Strategies In The Fight Against Meningitis: Molecular and Cellular Aspects.* 2002; Reino Unido: Horizon Scientific Press.
- Bishop RE.** *Mol Microbiol.* 2005. 57: 900-912.
- Blair J, Piddock L.** *Current Opinion in Microbiology.* 2009. 12: 512-519.
- Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I, Maïnassara HB, Tenebray B, Kairo KK, Giorgini D, Chanteau S.** *Clin Infect Dis.* 2007. 44: 657-663.
- Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE.** *Trends Microbiol.* 2011. 19: 419-426.
- Buchanan SK.** *Trends Biochem Sci.* 2001. 26: 3 – 6.
- Busch A, Waksman G.** *Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012. 367: 1112-1122. doi: 10.1098/rstb.2011.0206.
- Busnel JM, Varenne A, Descroix S, Peltre G, Gohon Y, Gareil P.** *Electrophoresis.* 2005. 26: 3369-3379.
- Cadieux N, Kadner RJ.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96: 10673-10674.
- Camacho AI, de Souza J, Sánchez-Gómez S, Pardo-Ros M, Irache JM, Gamazo C.** *Vaccine.* 2011. 29: 8222-8229.

- Carbonnelle E, Hill DJ, Morand P, Griffiths NJ, Bourdoulous S, Murillo I, Nassif X, Virji M.** *Vaccine*. 2009. 27: 78-89.
- Caroff M, Karibian D.** *Carbohydr Res*. 2003. 338: 2431-2447.
- Caugant DA, Frøholm LO, Bøvre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LF, Zollinger WD, Selander RK.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986. 83: 4927-4931.
- Chai TJ, Foulds J.** *Biochim Biophys Acta*. 1977. 493: 210-215.
- Chang C, Takayanagi A, Yoshida T, Shimizu N.** *J Immunol Methods*. 2011. 372: 127-136.
- Chang CC, Chen WC, Ho TF, Wu HS, Wei YH.** *J Biosci Bioeng*. 2011. 111: 501-511.
- Chen J, Kuroda T, Huda MN, Mizushima T, Tsuchiva T.** *J Antimicrob Chemother*. 2003. 52: 176-179.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R.** *Cell*. 2012. 148: 1258-1270.
- Cornelis GR.** *Biol Chem*. 2010. 391: 745-751.
- Cotter RJ, Griffith W, Jelinek C.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007. 855: 2-13.
- Da Silva GJ, Mendonça N.** *Virulence*. 2012. 3: 18-28.
- Dairi T.** *Methods Enzymol*. 2012. 515: 107-122. doi: 10.1016/B978-0-12-394290-6.00006-9.
- Dalili D, Fouladdel S, Rastkari N, Samadi N, Ahmadkhaniha R, Ardavan A, Azizi E.** *Nat Prod Res*, 2011. 26: 2078-2083.
- Dalvi SD, Worobec EA.** *Indian J Med Microbiol*. 2012. 30:302-307.
- Davidson AL, Maloney PC.** *Trends in Microbiology*. 2007. 15: 448-455.
- Delcour AH.** *Biochim Biophys Acta*. 2009. 1794: 808-816.
- Deng M, Mehta S, Sun F, Chen T.** *Genome Res*. 2002. 12: 1540-1548.
- Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR.** *Curr Issues Mol Biol*. 2004. 6: 111-124.
- Dornmair K, Kiefer H, Jähnig F.** *J Biol Chem*. 1990. 265: 18907-18911.
- Dresler J, Klimentova J, Stulik J.** *J Proteomics*. 2011. 75: 257-269.
- Fang J, Wei Y.** *Protein Pept Lett*. 2011. 18: 601-608.
- Fender JE, Bender CM, Stella NA, Lahr RM, Kalivoda EJ, Shanks RM.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78: 6225-6235.
- Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H.** *Microbes Infect*. 2010. 12: 89-98.
- Foglia EE, Fraser VJ, Elward AM.** *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 28: 299-306.
- Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT.** *Rev Infect Dis*. 1985. 7: 504-510.
- Freixeiro P, Diéguez-Casal E, Costoya L, Marzoa J, Ferreirós CM, Criado MT, Sánchez S.** *J. Proteome Res*. 2012. 12: 777-784.
- Gerlach RG, Hensel M.** *International Journal of Medical Microbiology*. 2007. 297: 401-415.

- Gómez JA, Criado MT, Ferreirós CM. *Res Microbiol.* 1998. 149: 382–387.
- Goqichaeva NV, Williams T, Alterman MA. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2007. 18: 279-284.
- Guan L, Kaback HR. *Biochemistry.* 2009. 48: 9250-9255.
- Gupta N, Manevich Y, Kazi AS, Tao JQ, Fisher AB, Bates SR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006. 291: L436-446.
- Hadano Y, Kamiya T, Uenishi N. *Intern Med.* 2012. 51: 1425-8.
- Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. *Vaccine.* 2009. 27: B51-63. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.063.
- Hemaprabha E. *J Pharm Sci Inno.* 2012. 1: 22-26.
- Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 5011-5015.
- Holland IB, Schmitt L, Young J. *Mol Membr Biol.* 2005. 22: 29-39.
- Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Hudson S, Livermore DM, Woodford N. *J Antimicrob Chemother.* 2010. 65: 479-482.
- Hritonenko V, Stathopoulos C. *Mol Membr Biol.* 2007. 24: 395-406.
- Hurst GB, Lankford TK, Kennel SJ. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2004. 15: 832-839.
- Irie M. *Pharmacol Ther.* 1999. 81: 77-89.
- Itoh Y, Rice JD, Goller C, Pannuri A, Taylor J, Meisner J, Beveridge TJ, Preston JF 3rd, Romeo T. *J Bacteriol.* 2008. 190: 3670-3680.
- Jacob-Dubuisson F, Loch C, Antoine R. *Mol Microbiol.* 2001. 40: 306-313.
- Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. *Res Microbiol.* 2008. 159: 187-193.
- Johnson JR, Kuskowski MA, Smith K, O'Bryan TT, Tatini S. *J Infect Dis.* 2005. 191: 1040-1049.
- Jormakka M, Törnroth S, Byrne B, Iwata S. *Science.* 2002. 295: 1863-1868.
- Kahler CM, Stephens DS. *Crit Rev Microbiol.* 1998. 24: 281-334.
- Kaufman BA, Newman SM, Hallberg RL, Slaughter CA, Perlman PS, Butow RA. *Proc Natl Acad U S A.* 2000. 97: 7772-7777.
- Keenan JJ, Allardyce RA. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 12: 1267-1273.
- Kihara A, Akiyama Y, Ito K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. 94: 5544-5549.
- Kim KM, Yi EC, Kim Y. *Methods.* 2012. 56: 161-165. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.10.013.
- Kim S, Malinverni JC, Sliz P, Silhavy TJ, Harrison SC, Kahne D. *Science.* 2007. 317: 961-964.
- Klebba PE. *Res Microbiol.* 2002. 153: 417-424.
- Klein C, García-Rizo C, Bisle B, Scheffer B, Zischka H, Pfeiffer F, Siedler F, Oesterhelt D. *Proteomics.* 2005. 5: 180-197

- Kleinschmidt JH.** *Chem Phys Lipids*. 2006. 141: 30-47.
- Kline KA, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ.** *Trends in Microbiology*. 2010. 18: 224-232. doi: 10.1016/j.tim.2010.03.002.
- Klockenbusch C, O'Hara JE, Kast J.** *Anal Bioanal Chem*. 2012. 404: 1057-1067.
- Kluger R, Alagic A.** *Bioorg Chem*. 2004. 32: 451-472.
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P.** *Molecular Microbiology*. 2000; 37: 239-253.
- Kolling G L, Matthews KR.** *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65:1843-1848.
- Korkhov VM, Mireku SA, Locher KP.** *Nature*. 2012. 490: 367-372.
- Kovacic L, Sribar J, Krizaj I.** *Bioorg Chem*. 2007. 35: 295-305.
- Kuhn HM, Meier-Dieter U, Mayer H.** *FEMS Microbiol Rev*. 1988. 4: 195-222.
- Kulp A, Kuehn MJ.** *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. 64: 163-184.
- Kurdistani SK, Grunstein M.** *Methods*. 2003. 31: 90-95.
- Kuroda T, Tsuchiya T.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. 1794: 763-768.
- Laemmli UK.** *Nature*. 1970. 227: 680.
- Lalonde S, Ehrhardt DW, Loqué D, Chen J, Rhee SY, Frommer WB.** *Plant J*. 2008. 53: 610-635.
- Lan CY, Igo MM.** *J Bacteriol*. 1998. 180: 171-174.
- Lasserre JP, Beyne E, Pyndiah S, Lapailierie D, Claverol S, Bonneu M.** *Electrophoresis*. 2006. 27: 3306-3321.
- Law CJ, Maloney PC, Wang DN.** *Annu Rev Microbiol*. 2008. 62: 289-305.
- Lee EY, Bang JY, Park GW, Choi DS, Kang JS, Kim HJ, Park KS, Lee JO, Kim YK, Kwon KH, Kim KP, Gho YS.** *Proteomics*. 2007. 7: 3143-3153.
- Lee EY, Choi DS, Kim KP, Gho YS.** *Mass Spectrometry Reviews*. 2008. 27: 535-555.
- Lee PS, Lee KH.** *Biotechnology and Bioengineering*. 2003; 84: 801-814.
- Leitner A, Walzthoeni T, Kahraman A, Herzog F, Rinner O, Beck M, Aebersold R.** *Mol Cell Proteomics*. 2010. 9: 1634-49. doi: 10.1074/mcp.R000001-MCP201.
- Leverrier P, Vertommen D, Collet JF.** *Proteomics*. 2010. 10: 771-784.
- Li XZ, Zhang L, Poole K.** *J Antimicrob Chemother*. 2000. 45: 433-436.
- Ling S, Cheng A, Pumpens P, Michalak M, Holoshitz J.** *PLoS One*. 2010. 5: e11703.
- Lindmark B, Rompikuntal PK, Vaitkevicius K, Song T, Mizunoe Y, Uhlin BE, Guerry P, Wai SN.** *BMC Microbiol*. 2009. 9:220. doi: 10.1186/1471-2180-9-220.
- Lovelle M, Mach T, Mahendran KR, Weingart H, Winterhalter M, Gameiro P.** *Phys Chem Chem Phys*. 2011. 13: 1521-1530.
- Luo ZQ.** *Cell Microbiol*. 2012. 14: 19-27.
- Lycklama A, Nijeholt JA, Driessen AJ.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012. 367: 1016-1028.

- Maddalo G, Chovanec P, Stenberg-Bruzell F, Nielsen HV, Jensen-Seaman MI, Ilag LL, Kline KA, Daley DO. *Proteomics*. 2011. 11: 3935-3941.
- Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. *Mass Spectrom Rev*. 1998. 17: 1-35.
- Marzoa J, Sánchez S, Ferreirós CM, Criado MT. *J Proteome Res*. 2010. 9: 611-619.
- Mattow J, Siejak F, Hagens K, Schmidt F, Koehler C, Treumann A, Schaible UE, Kaufmann SH. *Proteomics*. 2007. 7: 1687-1701.
- McMahon KJ, Castelli ME, García Vescovi E, Feldman MF. *J Bacteriol*. 2012. 194: 3241-3249.
- Merk O, Reiser K, Speit G. *Mutat Res*. 2000. 471: 71-80.
- Metz B, Kersten GFA, Hoogerhout P, Brugghe HF, Timmermans HAM, de Jong A, Meiring H, ten Hove J, Hennink WE, Crommelin DJA, Jiskoot W. *J Biol Chem*. 2004. 279: 6235-6243.
- Metz B, Kersten GF, Baart GJ, de Jong A, Meiring H, ten Hove J, van Steenberg MJ, Hennink WE, Crommelin DJ, Jiskoot W. *Bioconjug Chem*. 2006. 17: 815-822.
- Miernyk JA, Thelen JJ. *Plant J*. 2008. 53: 597-609.
- Miller MJ, Hermodson M, Gennis RB. *J Biol Chem*. 1988. 263: 5235-5240.
- Mogi T, Mizuochi-Asai E, Endou S, Akimoto S, Nakamura H. *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1757: 860-864.
- Moshiri A, Dashtbani-Roozbehani A, Najar Peerayeh S, Davar Siadat S. *Hum Vaccin Immunother*. 2012. 8: 953-955.
- Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2011. 28: 648-656.
- Müller MQ, Sinz A. *Methods Mol Biol*. 2012. 803: 205-218. doi: 10.1007/978-1-61779-364-6_14.
- Mulvey MA, Hultgren SJ. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2004. USA. Elsevier Academic Press.
- MurrayPR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica* (5ª Ed.). 2006. España. Elsevier Academic Press.
- Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Nishino K, Yamaguchi A. *Nature*. 2011. 480: 565-569.
- Neff D, Dencher NA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999. 259: 569-575.
- Neuhoff V, Stam R, Eibl H. *Electrophoresis*. 1985. 6: 427-448.
- Nougayrède JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS. *Cell Microbiol*. 2003. 5: 359-372.
- Obermaier C, Jankowski V, Schmutzler C, Bauer J, Wildgruber R, Infanger M, Köhrle J, Krause E, Weber G, Grimm D. *Electrophoresis*. 2005. 26: 2109-2116.
- O'Farrell PH. *J Biol Chem*. 1975. 250: 4007-4021.

- Opal SM.** *Int J Med Microbiol.* 2007. 297: 365-377.
- Orlando V.** *Trends Biochem Sci.* 2000. 25: 99-104.
- Page MG.** *Handb Exp Pharmacol.* 2012. 211: 67-86. doi: 10.1007/978-3-642-28951-4_5
- Pan JY, Li H., Ma Y., Chen P., Zhao P., Wan SY, Peng X.** *Journal of Proteome Research.* 2010. 9: 3730-3740.
- Pandey R, Chander R, Sainis KB.** *Indian J Biochem Biophys.* 2007. 44: 295-302
- Pautsch A, Schulz GE.** Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat Struct Biol.* 1998. 5: 1013-1017.
- Perez-Romero P, Imperiale MJ.** *Methods Mol Med.* 2007. 131: 123-139.
- Perry RH, Cooks RG, Noll RJ.** *Mass Spectrom Rev.* 2008. 27: 661-699.
- Phizicky EM, Fields S.** *Microbiol Rev.* 1995. 59: 94-123.
- Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, Silhavy TJ.** *Mol Microbiol.* 1996. 20: 911-917.
- Prinz A, Reither G, Distar M, Schultz C.** *Proteomics.* 2008. 8: 1179-1196.
- Pugsley AP, Francetic O, Hardie K, Possot OM, Sauvonnnet N, Seydel A.** *Folia Microbiol (Praha).* 1997. 42: 184-192
- Rao G, Santhoshkumar P, Sharma KK.** *Mol Vis.* 2008. 26: 666-674.
- Reffuveille F, Connil N, Sanguinetti M, Posteraro B, Chevalier S, Auffray Y, Rince A.** *Infect Immun.* 2012. 80: 1728-1735.
- Reinman S, Thornber JP.** *Biochim Biophys Acta.* 1979. 387: 60-63.
- Reisinger V, Eichacker LA.** *Proteomics.* 2006. 6 Suppl 2: 6-15.
- Ricci DP, Hagan CL, Kahne D, Silhavy TJ.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. 109: 3487-3491.
- Richarme G.** *Biochem Int.* 1986. 12: 897-903.
- Richarme G, Heine HG.** *Eur J Biochem.* 156: 399-405.
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B.** *Nat Biotechnol.* 1999. 17: 1030-1032.
- Rodrigues AP, Holanda AR, Lustosa GP, Lóbrega SM, Santana WJ, Souza LB, Coutinho HD.** *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2006. 53: 89-93
- Ross DE, Ruebush SS, BRantley SL, Hartshorne RS, Clarke TA, Richardson DJ, Tien M.** *Appl Environ Microbiol.* 2007. 73: 5797-5808.
- Sánchez S, Abel A, Arenas J, Criado MT, Ferreirós CM.** *Res Microbiol.* 2006. 157: 136-142.
- Santhoshkumar P, Sharma KK.** *Biochim Biophys Acta.* 2002. 1598: 115-121.
- Santoni V, Molloy M, Rabilloud T.** *Electrophoresis.* 2000. 21: 1037-1053.
- Schägger H, von Jagow G.** *Anal Biochem.* 1991. 199: 223-231.

- Scholten RJ, Kuipers B, Valkenburg HA, Dankert J, Zollinger WD, Poolman JT. *J Med Microbiol*. 1994. 41: 236-243.
- Schneider D, Duperchy E, Depeyrot J, Coursange E, Lenski R, Blot M.. *BCM Microbiol*. 2002 2:18.
- Schooling SR, Beverdige TJ. *J Bacteriol*. 2006. 188: 5945-57.
- Schröder G, Lanka E. *Plasmid*. 2005. 54: 1-25.
- Senior AE. *J Biol Chem*. 2012. 287: 30049-30062. doi: 10.1074/jbc.X112.402313.
- Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010. 2: a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
- Sinz A. *J Mass Spectrom*. 2003. 38: 1225-1237.
- Sinz A. *Anal Bioanal Chem*. 2010. 397: 3433-3440.
- Smith AW, Roche H, Trombe MC, Briles DE, Hakansson A. *Mol Microbiol*. 2002. 44: 431-448.
- Smith PK, Krohm RI, Hermason GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. *Anal. Biochem*. 1985. 150: 76-85.
- Spelbrink RE, Kolkman A, Slijper M, Killian JA, de Kruijff B. *J Biol Chem*. 2005. 280: 28742-28748.
- Sprinzak E, Sattath S, Margalit H. *J Mol Biol*. 2003. 11: 919-923
- Stenberg F, Chovanec P, Maslen SL, Robinson CV, Ilag LL, von Heijne G, Daley DO. *J Biol Chem*. 2005; 280: 34409-34419.
- Stengel F, Aebersold R, Robinson CV. *Mol Cell Proteomics*. 2012. 11: R111.014027. doi: 10.1074/mcp.R111.014027.
- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. *Lancet*. 2007. 369: 2196-2210.
- Suter B, Kittanakom S, Stagljar I. *Curr Opin Biotechnol*. 2008. 19: 316-323.
- Sutherland BW, Toews J, Kast J. *J Mass Spectrom*. 2008. 43: 699-715.
- Swatley JS, Marfin AA, Edupugantu S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997. 94: 271-276
- Symmons MF, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2009. 106: 7173-7178.
- Thelen JJ, Miernyk JA. *Biochem J*. 2012. 444: 169-181.
- Thermo Scientific Pierce Cross-linking Technical Handbook..
- Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, Jungblut PR. *Methods*. 2005. 35: 237-247
- Throck Watson J, David Sparkman O. *Introduction to mass spectrometry* (4th Edition). 2007. Wiley. England.
- Tikhonova EB, Zgurskaya HI. *J Biol Chem*. 2004. 279: 32116 – 32124.

- Tomazella GG, Risberg K, Mylvaganam H, Lindemann PC, Thiede B, Souza GA, Wiker HG. *J Proteomics*. 2012. 75: 1830-1837.
- Torreri P, Ceccarini M, Macioce P, Petrucci TC. *Ann Ist Super Sanità*. 2005. 41: 437-441.
- Toth J, Biggin MD. *Nucleic Acids Res*. 2000. 28: e4.
- Trakselis MA, Alley SC, Ismael FT. *Bioconjug Chem*. 2005. 16: 741-750.
- Udupa EG, Sharma KK. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005. 46: 2514-2521.
- Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. *Biochem Pharmacol*. 2000. 60: 457-470.
- Van Dyk TK, Templeton LJ, Cantera KA, Sharpe PL, Sariaslani FS. *J Bacteriol*. 2004. 186: 7196-7204.
- Van Houdt R, Givskov M, Michiels CW. *FEMS Microbiol Rev*. 2007. 31: 407-424.
- Vano-Galvan S, Alvarez-Twose I, Moreno-Martín P, Jaén P. *Int J Dermatol*. 2012. doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.05440.
- Vasilescu J, Guo X, Kast J. *Proteomics*. 2004. 4: 3845-3854.
- Villa J, Alba C, Barrado L, Sanz F, Del Castillo EG, Viedma E, Otero JR, Chaves F. *Pediatr Infect Dis J*. 2012
- Virji M. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7: 274-286.
- Voelz, A.; Müller, A.; Gillen, J.; Le, C.; Dresbach, T.; Engelhart, S.; Exner, M.; Bates, C. J.; Simon, A. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. 2010. 213: 79-87.
- von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, Bork P. *Nature*. 2002. 417: 399-403.
- Wang H, Andersen KK, Vad BS, Otzen DE. *Biochim Biophys Acta*. 2013. 1834: 127-136.
- Wang L, Wang Q, Reeves PR. *Subcell Biochem*. 2010. 53: 123-152.
- Weber J, Senior AE. *Biochim Biophys Acta*. 1997. 1319: 19-58.
- Weber J. *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1757: 1162-1170.
- Weiner JH, Li L. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778: 1698-1713.
- Whitfield C. *Annu. Rev. Biochem*. 2006. 75: 39-68.
- Whitfield C, Roberts IS. *Mol Microbiol*. 1999. 31: 1307-1319.
- Wilm M. *Mol Cell Proteomics*. 2011. 10: M111.009407.
- Wittig I, Schägger H. *Proteomics*. 2005. 5: 4338-4346.
- Wittig I, Schägger H. *Proteomics*. 2009. 9: 5214-5223.
- Wittig I, Karas M, Schägger H. *Mol Cell Proteomics*. 2007. 6: 1215-1225. PAG 43.
- Wittig I, Carrozzo R, Santorelli FM, Schägger H. *Electrophoresis*. 2007. 28: 3811-3820
- Wu YM, Hsu PC, Yang CC, Chang HJ, Ye JJ, Huang CT, Lee MH. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012.
- Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S. *Science*. 2003. 299: 700-704.

- Yokoyama R, Iwafune Y, Kawasaki H, Hirano H. *Anal Biochem.* 2009. 387: 60–63.
- Yoon H, Ansonq C, Adkins JN, Heffron F. *Infect Immun.* 2011. 79: 2182-2192.
- Zakharian E, Reusch RN. *FEBS Lett.* 2003. 555: 229-235.
- Zalewska-Piatek BM. *Pol J Microbiol.* 2011. 60: 279-285.
- Zhang L, Xie J, Wang X, Liu X, Tang X, Cao R, Hu W, Nie S, Fan C, Liang S. *Proteomics.* 2005. 5: 4510-4524.
- Zylicz M, Ang D, Liberek K, Georgopoulos C. *EMBO J.* 1989. 8: 1601-1608.
- <<http://myxo.css.msu.edu/ecoli/>>
- <<http://www.cect.org/vbac.php?cect=101&lan=es>
- <<http://www.cect.org/vbac.php?cect=846&lan=es>
- <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15402/Detergent_Selection_Table.pdf>



Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara

J. Saramago

Si ha de ser, será.

Anónimo